



SKRIPSI

**FERMENTASI HIDROLISAT ECENG GONDOK KERING
MENJADI ETANOL OLEH *Zymomonas mobilis* DAN
*Saccharomyces cerevisiae***

**NADYA EKA PRATIWI
NRP. 01211440000010**

**Dosen Pembimbing I
Yatim Lailun Ni'mah, M.Si., Ph. D.**

**Dosen Pembimbing II
Herdayanto S. Putro, S. Si., M. Si.**

**DEPARTEMEN KIMIA
FAKULTAS ILMU ALAM
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOMPEMBER
SURABAYA
2018**



SCRIPT

**DRY WATER HYACINTH HYDROLYSATE
FERMENTATION TO BE ETHANOL BY *Zymomonas mobilis*
AND *Saccharomyces cerevisiae***

**NADYA EKA PRATIWI
NRP. 01211440000010**

**Supervisor I
Yatim Lailun Ni'mah, M.Si., Ph. D.**

**Supervisor II
Herdayanto S. Putro, S. Si., M. Si.**

**DEPARTEMENT OF CHEMISTRY
FACULTY OF SCIENCE
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER
SURABAYA
2018**

**FERMENTASI HIDROLISAT ECENG GONDOK KERING
MENJADI ETANOL OLEH *Zymomonas mobilis* DAN
*Saccharomyces cerevisiae***

SKRIPSI

Disusun Untuk Memenuhi Salah Satu Syarat Memperoleh
Gelar Sarjana Program Studi S-1
Departemen Kimia
Fakultas Ilmu Alam
Institut Teknologi Sepuluh Nopember
Surabaya

NADYA EKA PRATIWI
NRP. 01211440000010

**DEPARTEMEN KIMIA
FAKULTAS ILMU ALAM
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER
SURABAYA
2018**

LEMBAR PENGESAHAN

FERMENTASI HIDROLISAT ECENG GONDOK KERING MENJADI ETANOL OLEH *Zymomonas mobilis* DAN *Saccharomyces cerevisiae*

SKRIPSI

Disusun oleh :

NADYA EKA PRATIWI
NRP. 01211440000010

Surabaya, 16 Juli 2018

Pembimbing I

Yatim Lailun Ni'mah, M.Si., Ph. D.
NIP. 19840524 200812 2 006

Pembimbing II

Herdyanto S. Putro, S.Si., M.Si.
NIP. 19810125 200812 1 001

Mengetahui,
Kepala Departemen Kimia



Prof. Dr. Didik Prasetyoko, M.Sc.
NIP. 19710616 199703 1 002

**FERMENTASI HIDROLISAT ECENG GONDOK KERING
MENJADI ETANOL OLEH *Zymomonas mobilis* DAN
*Saccharomyces cerevisiae***

Nama : Nadya Eka Pratiwi
NRP : 01211440000010
Jurusan : Kimia FIA – ITS
Dosen Pembimbing : Yatim Lailun Ni'mah, M.Si., Ph.D.
Herdayanto S. Putro, S.Si., M.Si.

ABSTRAK

Sumber energi yang paling banyak digunakan hingga saat ini masih berbasis bahan bakar fosil yang tidak dapat diperbarui dan tidak ramah lingkungan. Salah satu sumber energi alternatif yang dapat digunakan adalah bioetanol yang diproduksi dari biomassa lignoselulosa, seperti eceng gondok, dengan bantuan mikroorganisme. Pada penelitian ini dilakukan produksi etanol dengan proses hidrolisis eceng gondok kering dengan H_2SO_4 5% dan fermentasi hidrolisat menggunakan kultur campuran *Z. mobilis* dan *S. cerevisiae*. Glukosa hasil proses hidrolisis dianalisa dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan kadar etanol hasil fermentasi dianalisa menggunakan GC. Hasil analisa menunjukkan kadar glukosa sebesar 14 g/L atau 0,29 g/g bubuk kering eceng gondok dan kadar etanol fermentasi 12, 24, 36, dan 48 jam sebesar 2,7; 3,2; 4,2; dan 4,8 % dengan massa etanol yang dihasilkan sebesar 0,4076; 0,4406; 0,6614; 0,7237 g. Sementara *yield* etanol yang dihasilkan adalah 2,04; 2,20; 3,31; dan 3,62 %. Hasil etanol yang paling tinggi adalah pada fermentasi 48 jam dengan kadar etanol 4,8 %, massa etanol sebesar 0,7237 g, serta *yield* etanol keseluruhan sebesar 3,62 %.

***Kata kunci : Eceng Gondok, Bioetanol, Zymomonas mobilis,
Saccharomyces cerevisiae***

**DRY WATER HYACINTH HYDROLYSATE
FERMENTATION TO BE ETHANOL BY *Zymomonas mobilis*
AND *Saccharomyces cerevisiae***

Name : Nadya Eka Pratiwi
NRP : 01211440000010
Department : Kimia FIA – ITS
Supervisor : Yatim Lailum Ni'mah, M.Si., Ph.D.
Herdayanto S. Putro, S.Si., M.Si.

ABSTRACT

Availability and effect of fossil fuel become subject of concern these days. Many researches offer a low-cost renewable energy, such as bioethanol from lignocellulose material like water hyacinth. The aim of this research is to produce bioethanol by dry water hyacinth hydrolysate fermentation using *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces cerevisiae* mixed culture. Dry water hyacinth hydrolyzed by 5% H₂SO₄ to obtain glucose as the carbon source for microorganisms. Glucose content was analyzed by UV-Vis Spectrophotometer and the ethanol content after fermentation was analyzed by GC. Glucose obtained from the hydrolysis process was 14,5 g/L or 0,29 g/g water hyacinth dry mass. Ethanol produced from the fermentation process for 12, 24, 36, and 48 hours were 2,7; 3,2; 4,2; and 4,8 %. Ethanol mass formed in this research were 0,4076; 0,4406; 0,6614; 0,7237 g, respectively. Meanwhile, ethanol yield obtained from water hyacinth mass were 2,04; 2,20; 3,31; and 3,62 %, respectively. The optimum result from this research is from 48 hours fermentation with ethanol 4,8 % and yield from water hyacinth mass was 3,62 %.

Key words : *Bioethanol, Water Hyacinth, Zymomonas mobilis, Saccharomyces cerevisiae*

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Tuhan Yang Maha Esa yang selalu melimpahkan Rahmat dan karunia-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan dengan baik naskah tugas akhir yang berjudul “**FERMENTASI HIDROLISAT ECENG GONDOK KERING MENJADI ETANOL OLEH *Zymomonas mobilis* DAN *Saccharomyces cerevisiae***”. Tulisan ini tidak akan terwujud tanpa bantuan, dukungan, doa, serta dorongan semangat dari semua pihak. Sehingga penulis sangat berterima kasih kepada:

1. Yatim Lailun Ni'mah, M.Si., Ph.D. dan Herdayanto S. Putro, S.Si., M.Si. selaku Dosen Pembimbing yang telah memberikan pengarahan dan bimbingan selama proses penyusunan naskah Skripsi ini.
2. Dra. Ita Ulfin, M.Si. selaku kepala laboratorium Instrumentasi dan Sains Analitik atas fasilitas yang diberikan.
3. Drs. Refdinal Nawfa, M.S selaku kepala laboratorium Kimia Mikroorganisme atas fasilitas yang diberikan.
4. Prof. Dr. Didik Prasetyoko, M.Sc. selaku dosen wali.
5. Dra. Ratna Edianti, MS., Ph.D selaku Kepala Prodi Program Studi Kimia S1.
6. Prof. Dr. Didik Prasetyoko, M.Sc. selaku Kepala Departemen Kimia atas fasilitas yang diberikan.
7. Ibu, Bapak, dan Adik penulis yang selalu memberikan dukungan, semangat, serta doa yang tiada henti.
8. Teman-teman Kimia angkatan 2014, Galaxy atas segala kebersamaan dan bantuannya selama berkuliah di Kimia ITS.
9. Rekan-rekan seperjuangan di Lab. ISA dan Lab. KM atas semua bantuan, doa, dan pengalaman selama pengerjaan penelitian di laboratorium

10. Teman-teman Bidsu atas semua bantuan, doa, dan momen selama berkuliah. You are the best part of this journey!

Penulis menyadari bahwa penulisan naskah tugas akhir ini tidak lepas dari kekurangan, oleh karena itu penulis mengharapkan kritik dan saran untuk dapat meningkatkan kualitas dan perbaikan.

Surabaya, 16 Juli 2018

Penulis

DAFTAR ISI

LEMBAR PENGESAHAN.....	iv
ABSTRAK.....	v
ABSTRACT.....	vii
KATA PENGANTAR.....	viii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR TABEL.....	xiv
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Perumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Batasan Penelitian.....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1 Eceng Gondok.....	7
2.2 Konversi Eceng Gondok menjadi Bioetanol	9
2.2.1 Selulosa	9
2.2.2 Hemiselulosa	10
2.2.3 Lignin	10
2.2.4 Hidrolisis Asam	13
2.3 <i>Zymomonas mobilis</i>	15
2.4 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	18
2.5 Instrumentasi.....	19
2.5.1 Spektrofotometer UV-VIS	19
2.5.2 Kromatografi Gas	24

BAB III METODOLOGI	29
3.1 Alat dan Bahan.....	29
3.1.1. Alat	29
3.1.2. Bahan.....	29
3.2 Prosedur Kerja	30
3.2.1 Penentuan Kurva Standar Gula Reduksi Secara Spektrofotometri	30
3.2.2 Regenerasi Bakteri.....	30
3.2.3 Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri	30
3.2.4 Preparasi Biomassa Eceng Gondok	31
3.2.5 Hidrolisis Biomassa Eceng Gondok dengan Asam Encer.....	31
3.2.6 Pembuatan Stok Kultur	31
3.2.7 Pembuatan Media Fermentasi.....	32
3.2.8 Fermentasi Hidrolisat Eceng Gondok	32
3.3 Metode Analisa	33
3.3.1 Analisa Kandungan Glukosa dengan Metode Dubois <i>et al.</i>	33
3.3.2 Analisa Kadar Etanol.....	33
BAB IV PEMBAHASAN	35
4.1. Regenerasi Bakteri <i>Zymomonas mobilis</i>	35
4.2. Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri <i>Z. mobilis</i>	35
4.3. Pembuatan Kurva Standar Glukosa Secara Spektrofotometri	37
4.4. Hidrolisis Eceng Gondok	39
4.5. Fermentasi Hidrolisat Eceng Gondok dengan Kultur Campuran <i>Z. mobilis</i> dan <i>S. cerevisiae</i>	42

4.5.1. Pembuatan Media Fermentasi dari Hidrolisat Eceng Gondok	42
4.5.2. Fermentasi Hidrolisat Eceng Gondok	43
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	49
5.1. Kesimpulan	49
5.2. Saran	49
DAFTAR PUSTAKA	51
Lampiran 1 Diagram Alir Penelitian	59
Lampiran 2 Prosedur Penelitian	60
1. Pretreatment Fisik Eceng Gondok.....	60
2. Hidrolisis Bubuk Eceng Gondok dengan Asam Encer	61
3. Fermentasi Hidrolisat Eceng Gondok	62
Lampiran 3 Hasil Analisa GC	63
1. Standar etanol 98%	63
2. Fermentasi 12 jam.....	64
3. Fermentasi 24 jam.....	65
4. Fermentasi 36 Jam	66
5. Fermentasi 48 jam.....	67

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Tanaman Eceng Gondok (plants.usda.gov).	8
Gambar 2.2 Struktur Selulosa (Brown, 2003).	9
Gambar 2.3 Struktur Hemiselulosa Serat Karung Goni (Park et al., 2008).	10
Gambar 2.4 Model Struktur Lignin Penyumbat Botol (Chen, 2014).	11
Gambar 2.5 Jalur Metabolisme Entner-Doudoroff (Rogers et al., 1982).	17
Gambar 2.6 Skema Kerja Spektrofotometer UV-Vis Single Beam (McMahon, 2007).	21
Gambar 2.7 Ilustrasi Pengukuran Turbiditas pada Media Pertumbuhan Bakteri (Widdel, 2010).	23
Gambar 2.8 Pola Kurva Pertumbuhan Bakteri (Widdel, 2010).	23
Gambar 2.9 Skema Kerja Kromatografi Gas (McMahon, 2007).	26
Gambar 2.10 Kromatogram senyawa campuran asetaldehid (1), metanol (2), aseton (3), etanol (4), isopropanol (5), n-propanol (6), isobutanol (7), dan n-butanol (8) (Tangerman, 1997).	27
 Gambar 4.1 Regenerasi Bakteri <i>Z. mobilis</i> pada Media Agar Cawan Petri.	 35
Gambar 4.2 Kurva Pertumbuhan <i>Z. mobilis</i> pada Media Kompleks.	36
Gambar 4.3 Kurva Standar Glukosa.	39
Gambar 4.4 Ilustrasi Pengaruh Pretreatment pada Material Lignoselulosa.	40
Gambar 4.5 Bubuk Eceng Gondok Kering a.) Bubuk Daun Eceng Gondok; b.) Bubuk Batang Eceng Gondok.	41

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Perbandingan metode hidrolisis asam pekat dan asam encer.	14
Tabel 4.1 Tabel Konsumsi Glukosa dan Hasil Etanol Teoritis.....	44
Tabel 4.2 Kadar Etanol Sampel Hasil Fermentasi.	45
Tabel 4.3 Massa Etanol Sampel per Etanol Teoritis dari Konsumsi Glukosa	46
Tabel 4.4 Yield Etanol dibandingkan dengan massa bubuk eceng gondok.....	47

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Peningkatan populasi secara tidak langsung juga berperan dalam peningkatan penggunaan energi di dunia. Hingga saat ini, sumber energi yang paling banyak digunakan adalah bahan bakar fosil. Namun, bahan bakar fosil memiliki persediaan yang semakin terbatas seiring dengan berjalannya waktu, sedangkan menurut data dan proyeksi yang dilakukan oleh *US Energy Information Administration*, penggunaan bahan bakar fosil seperti minyak bumi dan batu bara akan terus meningkat hingga tahun 2040 (www.eia.gov/ieo). Selain itu, bahan bakar fosil juga dapat mencemari lingkungan apabila digunakan secara berlebihan karena dapat meningkatkan level karbon dioksida pada atmosfer dan merupakan salah satu penyebab global warming (Lora *et al.*, 2011). Oleh karena itu, diperlukannya sumber energi alternatif yang banyak tersedia serta ramah lingkungan. Salah satu sumber energi ramah lingkungan yang sedang banyak diteliti adalah bioetanol.

Biomassa merupakan salah satu sumber bioetanol yang sedang banyak diteliti saat ini. Ada dua jenis biomassa yang dapat digunakan sebagai bahan baku, yaitu biomassa dari tanaman yang dapat dikonsumsi (*edible*) dan biomassa dari tanaman yang tidak dapat dikonsumsi (*non-edible*). Penelitian terbaru saat ini lebih terfokuskan pada penggunaan biomassa *non-edible* sebagai bahan baku seperti tanaman sumber lignoselulosa, selulosa, dan alga laut (Demirbas, 2010; Ganguly *et al.*, 2012).

Eceng gondok (*Eichornia crassipess*) merupakan salah satu tanaman yang biomasnya dapat dimanfaatkan sebagai bahan baku bioetanol. Indonesia merupakan salah satu negara tropis yang perairannya banyak ditumbuhi oleh eceng gondok. Tanaman ini sering ditemukan pada perairan yang kotor dan tercemar limbah.

Salah satu contoh perairan yang banyak ditumbuhi tanaman eceng gondok adalah perairan yang berada di sekitar lingkungan ITS. Perairan ini merupakan perairan yang terdampak oleh pembuangan limbah rumah tangga di sekitar lingkungan ITS. Limbah rumah tangga yang dibuang ke perairan, seperti limbah deterjen, maupun limbah organik dan anorganik lain mengandung berbagai nutrisi yang akan merangsang pertumbuhan eceng gondok. Tumbuhnya eceng gondok pada perairan tercemar sebenarnya memiliki dampak yang baik. Eceng gondok dapat menjadi salah satu agen fitoremediasi dan berfungsi sebagai salah satu tanaman yang dapat menyerap berbagai senyawa berbahaya maupun logam berat yang mencemari perairan. Namun, dalam jumlah yang berlebihan, eceng gondok juga dapat memberikan dampak buruk pada lingkungan perairan seperti penyumbatan pada sungai dan sistem drainase, berkurangnya kandungan oksigen terlarut pada air, berkontribusi pada pencemaran lingkungan (Guragain *et al.*, 2011), dan eceng gondok juga merupakan tanaman air yang *non-edible* sehingga penggunaan eceng gondok sebagai bahan baku bioetanol tidak akan mengurangi persediaan bahan makanan. Selain itu, eceng gondok juga memiliki keuntungan lain apabila digunakan sebagai bahan baku produksi bioetanol, yaitu memiliki kandungan lignin yang sedikit. Eceng gondok mengandung 18-35% selulosa, 18-49% hemiselulosa, dan 3,5 – 9 % lignin (Kumar *et al.*, 2009).

Proses hidrolisis perlu dilakukan untuk dapat mengubah selulosa yang ada pada eceng gondok menjadi glukosa yang kemudian dapat diubah menjadi bioetanol. Salah satu cara yang sering digunakan dalam berbagai penelitian adalah hidrolisis dengan bantuan enzim selulase. Namun, penggunaan enzim membutuhkan biaya yang tinggi, sehingga dianggap perlu untuk mencari bahan lain yang dapat menghidrolisis biomassa lignoselulosa. Hidrolisis dengan bantuan asam merupakan salah satu cara yang dapat dilakukan untuk menghidrolisis biomassa lignoselulosa. Keuntungan hidrolisis asam

adalah harga asam yang lebih ekonomis apabila dibandingkan dengan enzim, asam dapat menembus lignin tanpa *pretreatment*, dan laju hidrolisis asam lebih cepat dibandingkan hidrolisis enzim, namun glukosa dapat terpecah dengan cepat (Cheung dan Anderson, 1996). Metode hidrolisis asam terbagi menjadi dua jenis, yaitu metode hidrolisis asam encer dan metode hidrolisis asam pekat. Hidrolisis asam encer merupakan salah satu metode yang banyak digunakan karena lebih aman, efektif, dan tidak membutuhkan terlalu banyak asam (Mohammad *et al.*, 2007).

Produksi bioetanol dengan bahan baku biomassa harus melalui proses fermentasi yang dibantu oleh mikroorganisme seperti ragi atau khamir (*Saccharomyces cerevisiae*) atau bakteri seperti *Zymomonas mobilis* (Letti *et al.*, 2012; Stewart, 2014). Kedua mikroorganisme ini memiliki banyak kelebihan pada proses fermentasi, yaitu kemampuan untuk mentolerir gula dengan konsentrasi tinggi, kemampuan hidup pada konsentrasi etanol yang tinggi, dan memiliki kemampuan yang baik untuk memproduksi etanol (Stewart, 2014; Rogers *et al.*, 1982). Terdapat beberapa penelitian yang telah dilakukan untuk produksi bioetanol menggunakan kultur campuran *Z. mobilis* dan *S. cerevisiae*, salah satunya, pada penelitian yang dilakukan oleh Abate *et al.* (1996) yang menggunakan mikroorganisme *Z. mobilis* dan *Saccharomyces* sp. hasil isolasi dari air tebu. Kedua mikroorganisme hasil isolasi ini kemudian digunakan pada fermentasi media sukrosa dan dibandingkan kadar etanol yang dihasilkan pada kultur campuran serta kultur tunggalnya. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kultur campuran akan memberikan kadar etanol lebih tinggi dibandingkan kultur tunggalnya. Sementara itu, melalui penelitian yang dilakukan oleh Ndaba *et al.* (2014), diketahui bahwa proses fermentasi dengan menggunakan kultur campuran *S. cerevisiae* dan *Z. mobilis* pada media glukosa dan xilosa menghasilkan kadar etanol yang lebih tinggi dibandingkan dengan proses fermentasi dengan kultur tunggal. Dapat disimpulkan bahwa proses fermentasi dengan menggunakan kultur

campuran *Z. mobilis* dan *S. cerevisiae* lebih menguntungkan untuk dilakukan.

Oleh karena itu, pada penelitian ini, akan dilakukan produksi bioetanol dari biomassa eceng gondok dengan kultur campuran *Z. mobilis* dan *S. cerevisiae* untuk proses fermentasi yang lebih efektif dan menghasilkan kadar bioetanol yang lebih tinggi. Penelitian ini diharapkan dapat menjadi solusi bagi permasalahan menumpuknya tanaman eceng gondok maupun semakin menipisnya sumber bahan bakar fosil.

1.2 Perumusan Masalah

Permasalahan pada penelitian ini adalah menumpuknya tanaman eceng gondok yang berpotensi mengganggu ekosistem perairan sehingga dibutuhkan cara untuk memanfaatkan eceng gondok menjadi sesuatu yang berguna. Salah satu caranya adalah dengan memproduksi bioetanol dari biomassa eceng gondok dengan proses fermentasi menggunakan kultur campuran *Z. mobilis* dan *S. cerevisiae*.

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah untuk memproduksi bioetanol dari biomassa eceng gondok dengan proses fermentasi menggunakan kultur campuran *Z. mobilis* dan *S. cerevisiae* serta diukur kadar bioetanol yang dihasilkan.

1.4 Batasan Penelitian

Batasan pada penelitian ini adalah fermentasi dengan menggunakan bahan baku eceng gondok (*Eichornia crassipess*) yang berada di perairan sekitar ITS dengan metode hidrolisis menggunakan H_2SO_4 5 % dan fermentasi dengan variasi waktu 12, 24, 36, dan 48

jam. Mikroorganisme yang digunakan adalah *S. cerevisiae* dan *Z. mobilis*.

“Halaman ini Sengaja Dikosongkan”

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Eceng Gondok

Eceng gondok (*Eichornia crasipess*) merupakan tanaman air yang berasal dari sungai Amazon dan hingga kini telah tersebar di seluruh penjuru dunia. Habitat eceng gondok adalah perairan dangkal berair keruh pada daerah tropis dan subtropis yang memiliki suhu 28 hingga 30 °C dan nilai pH sekitar 4 hingga 12. Di Indonesia, eceng gondok biasanya tumbuh di pinggiran sawah, rawa, danau, waduk maupun Kawasan pinggiran sungai (Gerbono, 2005). Karena banyak ditemukan di beberapa daerah di Indonesia, eceng gondok memiliki nama lain pada masing-masing daerah seperti Kelipuk (Palembang), Ringgak (Lampung), Ilung-ilung (Dayak), Tumpe (Manado), dan lain-lain. Kedudukan tanaman eceng gondok dalam taksonomi tumbuhan diklasifikasikan sebagai berikut :

Kerajaan	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Liliopsida
Ordo	: Liliales
Famili	: Pontederiaceae
Marga	: <i>Eichornia</i> Kunth
Jenis	: <i>E. crasipess</i>

(plants.usda.gov)

Eceng gondok merupakan tanaman yang mengapung di permukaan air dan memiliki tinggi sekitar 0,4 - 0,8 meter. Bagian tanaman eceng gondok terdiri dari helai daun, pengapung, leher daun, ligula, akar, akar rambut, ujung akar, dan stolon. Tanaman ini tidak memiliki batang dan daunnya berbentuk oval serta permukaannya licin. Eceng gondok memiliki bunga majemuk dan kelopaknya berbentuk tabung. Eceng gondok juga memiliki akar serabut dan tidak bercabang. Akarnya memiliki panjang yang bervariasi, mulai dari 10 cm hingga 300 cm (Aniek, 2003). Namun, eceng gondok yang tumbuh

pada lingkungan kaya akan unsur hara memiliki tinggi hingga 100 cm dan akar yang pendek (sekitar 20 cm). Bentuk fisik eceng gondok dapat dilihat pada Gambar 2.1.



Gambar 2.1 Tanaman Eceng Gondok (plants.usda.gov).

Eceng gondok dapat berkembang biak dengan cepat karena memiliki daya adaptasi yang baik terhadap lingkungan tumbuhnya. Dalam jumlah yang sedikit, eceng gondok memiliki banyak manfaat bagi lingkungan seperti kemampuannya untuk mengurangi kadar logam berat seperti Fe, Zn, Cu, Mn, Cd, dan Hg, maupun polutan berbahaya lain yang dapat membahayakan perairan (Kemeneg LH, 2009). Namun, dalam jumlah yang berlebihan, eceng gondok dapat memberikan dampak buruk pada lingkungan seperti penyumbatan pada sistem drainase dan berkurangnya kandungan oksigen terlarut pada air (Guragain *et al.*, 2011) yang menyebabkan ketidakseimbangan ekosistem perairan.

Eceng gondok mengandung hampir 20 % selulosa, 48 % hemiselulosa, dan 3,5 % lignin. Kandungan selulosa dan hemiselulosa yang tinggi pada eceng gondok dapat dimanfaatkan untuk sesuatu yang lebih bermanfaat seperti *biofuel*. Dikarenakan produktivitas eceng gondok yang tinggi, tanaman ini dapat digunakan sebagai bahan baku produksi *biofuel* (Sindhu *et al.*, 2017).

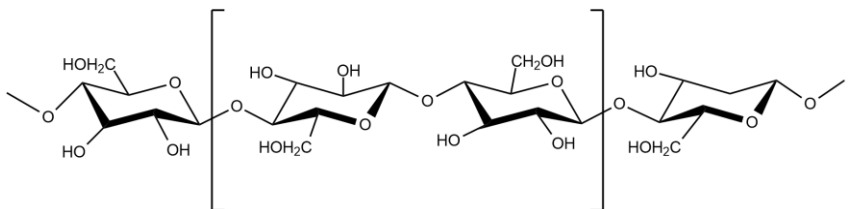
2.2 Konversi Eceng Gondok menjadi Bioetanol

Eceng gondok merupakan salah satu tanaman lignoselulosa. Biomassa yang berasal dari bahan lignoselulosa merupakan salah satu bahan baku berbasis karbon dari makhluk hidup yang sangat banyak digunakan sebagai bahan baku bioetanol. Supaya dapat menghasilkan etanol, tanaman lignoselulosa harus melalui beberapa tahap, yaitu *pretreatment*, hidrolisis, dan fermentasi.

Lignoselulosa memiliki struktur yang kompleks dan terdiri dari tiga komponen penyusun utama, yaitu selulosa, hemiselulosa dan lignin.

2.2.1 Selulosa

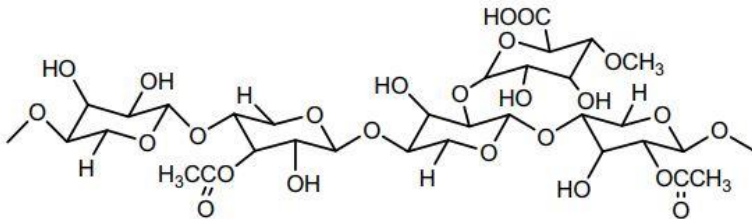
Selulosa ($C_6H_{10}O_5$)_x merupakan salah satu penyusun utama dari biomassa ligniselulosa. Selulosa merupakan polisakarida yang terdiri dari rantai lurus D-glukosa yang disambungkan oleh ikatan β -(1,4)-glikosidik. Rantai selulosa (20 - 300) berkumpul menjadi satu untuk membentuk mikrofibril, yang kemudian bergabung menjadi satu dan membentuk serat selulosa. Mikrofibril selulosa sebagian besar independen namun struktur selulosa terbentuk dikarenakan adanya ikatan kovalen, ikatan hydrogen, dan gaya Van der Waals. Ikatan hidrogen pada mikrofibril selulosa menentukan 'kelurusan' (straightness) rantai, namun ikatan hidrogen dalam rantai dapat menentukan keteraturan struktur selulosa (kristalin atau amorf) (Laureano-Perez *et al.*, 2005). Struktur selulosa ditunjukkan pada Gambar 2.2



Gambar 2.2 Struktur Selulosa (Brown, 2003).

2.2.2 Hemiselulosa

Hemiselulosa ($C_5H_8O_4$)_m merupakan penyusun lignoselulosa yang berada pada dinding sel sekunder. Hemiselulosa merupakan biopolimer yang terdiri dari pentosa (β -D-xyloza, α -L-arabinosa), hexosa (β -D-manosa, β -D-glukosa, α -D-galaktosa), dan/atau asam uronat α -D-glucuronat, α -D-4-O-metilgalakturonat, dan asam α -D-galakturonat (Girio *et al.*, 2010). Senyawa-senyawa tersebut relatif mudah untuk dihidrolisis karena strukturnya yang amorf dan berat molekulnya yang lebih rendah (Li *et al.*, 2010). Untuk meningkatkan konversi selulosa, hemiselulosa yang melindungi serat selulosa harus dipecah atau dilarutkan sehingga lebih mudah mencapai selulosa. Kelarutan senyawa-senyawa hemiselulosa pada air dimulai pada suhu 150 °C dengan kondisi netral (Garrote *et al.*, 1999). Namun, kelarutan komponen lignoselulosa tidak hanya bergantung pada suhu, tapi juga bergantung pada kandungan air dan pH (Fengel dan Wegener, 1984). Struktur penyusun hemiselulosa ditunjukkan pada Gambar 2.3

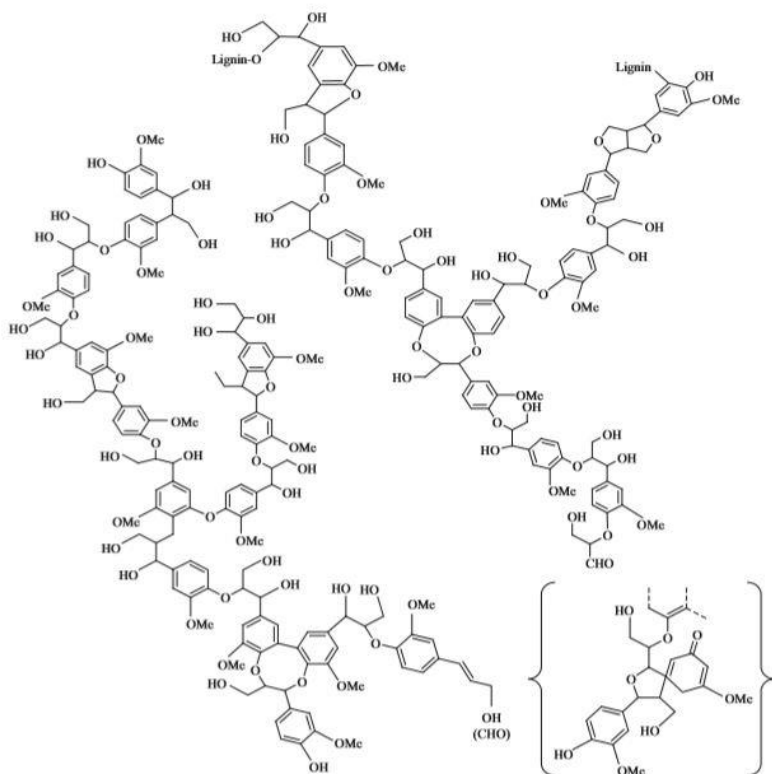


Gambar 2.3 Struktur Hemiselulosa Serat Karung Goni (Park *et al.*, 2008).

2.2.3 Lignin

Lignin merupakan polimer yang paling banyak ditemukan di alam setelah selulosa dan hemiselulosa. Lignin merupakan heteropolymer amorf yang terdiri dari tiga bentuk fenilpropana (p-kumaril, koniferil, dan sinapil alkohol) yang tergabung melalui beberapa jenis ikatan. Kegunaan lignin adalah sebagai pendukung struktur pada tanaman, memberikan sifat impermeabilitas, dan daya

tahan terhadap serangan mikroba serta tekanan oksidatif. Lignin juga memiliki sifat amorf (Fengel dan Wegener, 1984). Seperti halnya dengan hemiselulosa, lignin secara normal mulai terlarut dalam air pada suhu 180 °C dengan kondisi netral (Bobleter, 1994). Kelarutan lignin pada lingkungan asam, netral, atau basa bergantung pada prekursor lignin (p-kumaril, koniferil, sinapil alkohol, maupun kombinasi kesemuanya) (Grabber, 2005). Struktur penyusun lignin ditunjukkan pada Gambar 2.4



Gambar 2.4 Model Struktur Lignin Penyumbat Botol (Chen, 2014).

Untuk mengkonversi bahan lignoselulosa menjadi bioetanol, dibutuhkan perlakuan khusus yang dapat mengubah komponen-komponen dalam material lignoselulosa menjadi komponen yang dapat dicerna mikroorganisme pada proses fermentasi. Untuk mencapai hal tersebut dilakukan proses *pretreatment* dan hidrolisis yang dapat mengubah lignoselulosa menjadi senyawa-senyawa gula.

Pretreatment merupakan salah satu tahap yang melibatkan proses pemutusan ikatan hydrogen pada kristalin selulosa dan meningkatkan porositas serta luas permukaan selulosa untuk proses hidrolisis selanjutnya (Li *et al.*, 2010). Ada beberapa jenis *pretreatment* yang bisa digunakan pada proses konversi lignoselulosa menjadi bioetanol, yaitu *pretreatment* fisik, *pretreatment* kimia, *pretreatment* biologis, dan *pretreatment* fisik-kimia (Mood *et al.*, 2013).

Setelah proses *pretreatment*, dilakukan proses hidrolisis pada bahan lignoselulosa. Struktur ligniselulosa yang kompleks pada tanaman membentuk banteng perlindungan yang akan menghalangi bakteri dan jamur merusak sel. Untuk mengkonversi biomassa tanaman ligniselulosa menjadi etanol, selulosa dan hemiselulosa harus dipecah menjadi monomer yang sesuai (gula) sehingga mikroorganisme dapat menggunakannya sebagai bahan baku. Proses hidrolisis pada selulosa akan menghasilkan glukosa, sementara hidrolisis hemiselulosa akan menghasilkan beberapa pentosa dan hexose (Karimi *et al.*, 2006).

Ada dua proses utama untuk limbah kayu dan agrikultur yang dapat digunakan untuk membentuk berbagai macam gula yang dapat diubah menjadi etanol; hidrolisis kimiawi dan hidrolisis enzimatis (Broder *et al.*, 1995). Hidrolisis kimiawi merupakan hidrolisis yang melibatkan kontak biomassa lignoselulosa dengan bahan kimia dalam periode waktu dan suhu tertentu, menghasilkan monomer gula dari polimer selulosa dan hemiselulosa.

2.2.4 Hidrolisis Asam

Salah satu jenis asam yang banyak digunakan dalam hidrolisis kimiawi adalah H_2SO_4 . Jenis asam lain yang juga sudah banyak digunakan untuk menghidrolisis biomassa lignoselulosa adalah HCl . Hidrolisis asam dapat dibagi menjadi 2 yaitu hidrolisis asam pekat dan hidrolisis asam encer. Perbandingan antara hidrolisis asam pekat dan asam encer ditunjukkan pada Tabel 2.1.

Hidrolisis menggunakan asam pekat secara umum dilaporkan memberikan hasil gula yang lebih tinggi (misalnya 90 % dari hasil teoritis gula) dan menghasilkan etanol yang lebih tinggi dibandingkan proses hidrolisis yang menggunakan asam encer. Selain itu, hidrolisis yang menggunakan asam pekat dapat dilakukan pada suhu yang lebih rendah (contohnya, $40^\circ C$). Kedua hal tersebut merupakan kelebihan yang jelas terlihat apabila dibandingkan dengan menggunakan asam encer. Namun, konsentrasi asam yang digunakan pada proses hidrolisis ini sangat tinggi, berkisar antara 30 – 70 %, serta sifatnya yang sangat korosif pada saat pemanasan selama proses hidrolisis. Oleh karena itu, proses ini membutuhkan alat-alat dengan bahan dasar alloy berkualitas baik ataupun bahan khusus lainnya yang memiliki ketahanan terhadap asam. Selain itu, proses netralisasi hidrolisat yang dihasilkan akan menjadi sangat sulit untuk dilakukan. Investasi serta biaya pemeliharaan yang tinggi menurunkan minat penggunaan metode hidrolisis asam pekat secara komersial (Katzen *et al.*, 1995; Wyman, 1996).

Diantara metode hidrolisis kimia yang ada, hidrolisis asam encer merupakan metode yang paling sering digunakan. Metode ini dapat digunakan sebagai *pretreatment* sebelum hidrolisis enzimatis, maupun sebagai proses hidrolisis lignoselulosa menjadi gula yang sebenarnya (Qureshi dan Manderson, 1995).

Tabel 2.1 Perbandingan metode hidrolisis asam pekat dan asam encer.

Metode Hidrolisis	Kelebihan	Kekurangan
Hidrolisis Asam Pekat	<ul style="list-style-type: none"> - Dilakukan pada suhu rendah - Menghasilkan kandungan gula yang tinggi 	<ul style="list-style-type: none"> - Penggunaan asam yang lebih banyak - Terjadinya korosi pada peralatan - Konsumsi energi yang banyak untuk <i>acid recovery</i> - Waktu reaksi yang lebih lama
Hidrolisis Asam Encer	<ul style="list-style-type: none"> - Penggunaan asam yang lebih sedikit - Waktu reaksi yang lebih sebentar 	<ul style="list-style-type: none"> - Dilakukan pada suhu tinggi - Menghasilkan gula yang rendah - Terjadinya korosi pada peralatan - Terbentuknya produk samping yang tidak diinginkan

(Taherzadeh dan Karimi, 2007)

Proses hidrolisis asam encer yang pertama kali ditemukan adalah proses Scholler (Faith, 1945) dimana dilakukan proses *batch* dengan material kayu yang direndam dalam 0,5 % asam sulfat pada tekanan 11 - 12 bar selama kurang lebih 45 menit. Dikarenakan prosesnya yang tidak membutuhkan asam dengan konsentrasi yang terlalu tinggi, maupun waktu yang terlalu lama, maka proses ini lebih efektif digunakan baik pada skala laboratorium maupun pada skala komersil. Salah satu penelitian yang menggunakan proses hidrolisis asam untuk memecah selulosa dan hemiselulosa menjadi glukosa adalah penelitian yang dilakukan oleh Harun *et al.* (2011). Penelitian ini menunjukkan bahwa hidrolisis bubuk eceng gondok yang telah dikeringkan dengan H₂SO₄ 5 % selama 1 jam pada suhu 121 °C memberikan *yield* glukosa sebesar 47,42 mg/g.

Setelah dihasilkan gula dari proses hidrolisis, diperlukan satu

proses akhir untuk mengubah gula menjadi etanol. Proses ini membutuhkan bantuan mikroorganisme dan disebut dengan proses fermentasi. Ada beberapa mikroorganisme yang digunakan dalam fermentasi dengan bahan baku biomassa eceng gondok, seperti *Saccharomyces cerevisiae* (Zhang *et al.*, 2017), *Zymomonas mobilis* (Sambo *et al.*, 2015), *Pichia stipitis* (Ganguly *et al.*, 2012), *Clostridium thermocellum* (Das *et al.*, 2016), *Candida intermedia* (Manivannan *et al.*, 2012). Namun mikroorganisme yang paling baik dalam memproduksi etanol dari hexosa adalah *S. cerevisiae* dan *Z. mobilis* (Talebna *et al.*, 2010).

2.3 *Zymomonas mobilis*

Zymomonas mobilis merupakan salah satu bakteri anaerobic fakultatif yang dapat memproduksi etanol. Nama *Zymomonas mobilis* berasal dari metabolismenya yang unik. *Z. mobilis* memiliki sifat seperti ragi yang dapat melakukan fermentasi etanol (= *Zymo*) menggunakan jalur glikolitik Entner Doudoroff (ED) yang ditemukan pada *Pseudomonas* (= *monas*). *Z. mobilis* memiliki beberapa karakteristik sebagai berikut :

- Berbentuk batang dengan panjang 2 - 6 μm dan lebar 1 - 1,4 μm
- Merupakan bakteri Gram-negatif
- Tidak memproduksi spora
- Bersifat anaerobik namun tahan dalam jumlah oksigen yang kecil (anaerobik fakultatif)
- Dapat memfermentasi glukosa dan fruktosa
- Merupakan bakteri oksidase-negatif

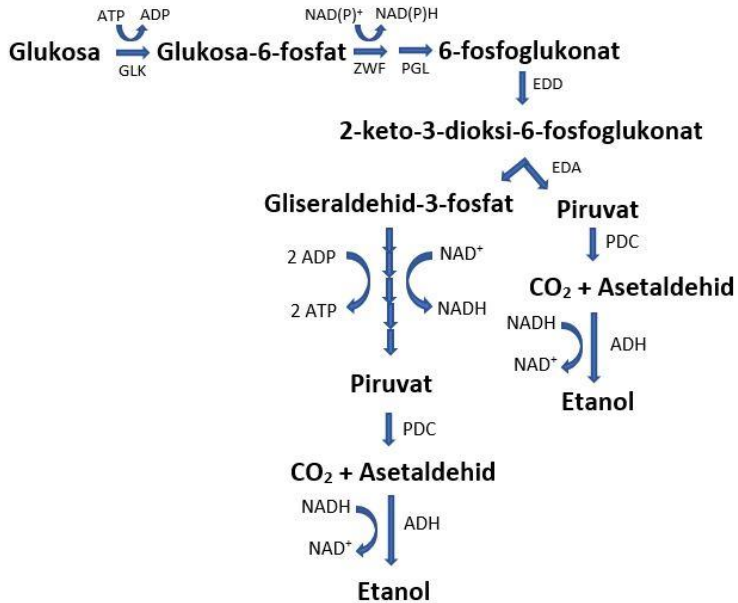
(Yanase, 2014)

Klasifikasi *Z. mobilis* adalah sebagai berikut :

Kerajaan	: Bakteria
Filum	: Proteobakteria
Kelas	: Alpha Proteobacteria
Famili	: Sphingomonadaceae
Marga	: <i>Zymomonas</i>
Jenis	: <i>Zymomonas mobilis</i>

Z. mobilis yang ditumbuhkan pada media standar selama 2 hari pada suhu 30 °C merupakan koloni yang berwarna putih-krem dan memiliki diameter sebesar 1 - 2 mm. *Zymomonas* merupakan *strain* bakteri yang tidak berbahaya bagi manusia dan sering digunakan untuk membuat minuman beralkohol. Sebagian besar *strain* *Zymomonas* mampu tumbuh pada pH 3,5, namun, organisme ini tidak tumbuh pada pH dibawah 3,05. *Zymomonas* juga merupakan bakteri termolabil dan tumbuh secara optimal pada suhu 25 °C dan 30 °C.

Z. mobilis memiliki beberapa ciri khusus yang dapat memproduksi etanol secara efisien, seperti kemampuan beberapa *strain* untuk mentolerir gula dengan konsentrasi tinggi (hingga 400 g/L), kemampuan beberapa *strain* untuk mentolerir etanol dengan konsentrasi tinggi (hingga 100 g/L) serta kemampuan untuk memberikan hasil akhir etanol yang tinggi (hingga 1,9 ml etanol per mol glukosa pada kondisi anaerob) (Rogers *et al.*, 1982). *Z. mobilis* dapat menfermentasi glukosa, fruktosa, dan sukrosa melalui jalur *Entner-Doudoroff* (ED) dengan bantuan enzim piruvat dekarboksilasi dan ADH menghasilkan etanol dan karbon dioksida (Dawes *et al.*, 1966). Metabolisme dengan jalur *Entner-Doudoroff* ditunjukkan pada Gambar 2.5



Gambar 2.5 Jalur Metabolisme *Entner-Doudoroff* (Rogers *et al.*, 1982).

Dibandingkan dengan *yeast* atau *S. cerevisiae*, *Z. mobilis* memiliki banyak kelebihan pada proses fermentasi, seperti hasil etanol yang lebih tinggi, produksi biomasa yang lebih rendah, konsumsi gula dan kecepatan produktivitas etanol yang lebih tinggi, serta lebih fleksibel terhadap oksigen (Rogers *et al.*, 1982). Beberapa penelitian menggunakan bakteri *Z. mobilis* untuk proses fermentasi pada berbagai macam media. Penelitian yang dilakukan oleh Behera *et al.* pada tahun 2009 menunjukkan bahwa *Z. mobilis* dapat memfermentasi media fermentasi yang berasal dari bubur bunga *Madhuca latifolia* L. dan menghasilkan etanol dengan konsentrasi sebesar 20,47 g/L. Selain itu, penelitian yang dilakukan oleh Ndaba *et al.*, pada tahun 2014 menunjukkan bahwa *Z. mobilis* dapat memfermentasi media yang mengandung campuran glukosa dan

xilosa dan menghasilkan etanol dengan konsentrasi 3,87 g/L.

2.4 *Saccharomyces cerevisiae*

S. cerevisiae merupakan salah satu ragi yang paling sering digunakan oleh manusia pada produksi makanan maupun minuman beralkohol. Ragi ini merupakan salah satu ragi yang paling banyak dipelajari dan merupakan model sistem untuk dasar penelitian sel eukariotik pada bidang ilmu biologi (Stewart, 2014). Klasifikasi *S. cerevisiae* adalah sebagai berikut :

Kerajaan	: Fungi
Filum	: Ascomycota
Kelas	: Saccharomycetes
Ordo	: Saccharomycetales
Famili	: Saccharomyceteceae
Marga	: Saccharomyces
Jenis	: <i>S. cerevisiae</i>

Saccharomyces memiliki toleransi yang baik terhadap etanol konsentrasi tinggi. *S. cerevisiae* merupakan ragi jenis fungi yang bereproduksi dengan cara membentuk tunas dan sel anak yang prosesnya disebut budding. Budding merupakan proses membengkaknya sitoplasma dan keluar dari dinding sel. Tonjolan atau bud ini akhirnya membesar dan memisah untuk kemudian membentuk sel yang baru (Samson *et al.*, 1984). Tiap strain *S. cerevisiae* memiliki ketahanan terhadap alkohol yang berbeda-beda, namun secara umum, sebagian besar strain dapat tumbuh pada lingkungan yang memiliki konsentrasi etanol 8 – 12 % (v/v) dan bisa bertahan hingga konsentrasi 15%. Sensitivitas ragi ini terhadap etanol akan meningkat apabila suhu yang digunakan >30 °C atau <10 °C. seperti ragi jenis lain, *S. cerevisiae* lebih suka media yang sedikit asam dengan pH optimum sekitar 4,5 hingga 6,5. Namun, spesies ini memiliki toleransi pH yang cukup baik karena mampu tumbuh dengan lambat pada pH 1,6 (HCl); 1,7 (H₃PO₄); dan 1,8 - 2,0 (asam organik).

Saccharomyces dapat memfermentasi gula hexosa seperti D-glukosa, D-fruktosa, dan D-manosa. Biasanya kecepatan fermentasi D-glukosa merupakan yang paling cepat dibandingkan dengan gula yang lain. Jenis gula lain yang dapat difermentasi oleh *S. cerevisiae* adalah sukrosa, maltose maltotriosa, dan D-galaktosa (Stewart, 2014). Beberapa penelitian telah dilakukan untuk melihat kemampuan fermentasi *S. cerevisiae* pada berbagai macam media. Salah satu contohnya adalah pada penelitian yang dilakukan oleh Choi *et al.*, 2010 yang memfermentasi hidrolisat bubuk singkong dengan *S. cerevisiae* CHY1011 dan CHFY0910 dan menghasilkan etanol dengan konsentrasi sebesar $89,1 \pm 0,87$ g/L dan $83,8 \pm 1,11$ g/L pada waktu fermentasi 66 jam. Sementara penelitian yang dilakukan oleh Ndaba *et al.*, 2014 dengan menggunakan *S. cerevisiae* yang didapatkan dari ragi komersial dan diperoleh etanol dengan konsentrasi 6,7 g/L pada waktu fermentasi 48 jam.

2.5 Instrumentasi

2.5.1 Spektrofotometer UV-VIS

Spektrofotometri serapan merupakan pengukuran suatu interaksi antara radiasi elektromagnetik dan molekul atau atom dari suatu zat kimia. Sebagian besar molekul menyerap radiasi ultraviolet (UV) dan *visible* (Vis). Penyerapan radiasi UV dan/atau Vis berhubungan dengan eksitasi elektron terluar pada molekul tersebut. Prinsip kerja spektrofotometer UV-Vis adalah dengan melewati radiasi dengan intensitas tertentu melalui larutan sampel yang biasanya berada pada kuvet quartz. Ketika keluar dari sisi lain kuvet, intensitas radiasi berkurang dikarenakan a) pantulan kuvet, b) penghamburan, dan c) penyerapan molekul sampel. Pada molekul organik, penyerapan ini disebabkan gugus fungsi tertentu (kromofor) yang mengandung elektron dengan energi eksitasi yang rendah (McMahon, 2007). Istilah UV-VIS biasanya digunakan untuk radiasi pada panjang gelombang

dengan *range* 200-800 nm. Ada banyak gugus kimia yang menyerap cahaya dibawah panjang gelombang 200 nm, namun spektra pada bagian ini sulit untuk diamati kecuali spektra tersebut diukur pada keadaan vakum (Anderson *et al.*, 2004).

Ada beberapa jenis spektrofotometer UV-VIS yang ada pada masa ini. Contohnya adalah spektrofotometer UV-VIS *double beam* yang terdiri dari sumber cahaya UV-VIS, dua sel yang dilewati cahaya, dan detektor (biasanya fotomultiplier) untuk mengukur jumlah cahaya yang melewati sel. Spektrofotometer dasar biasanya mengukur absorbansi pada satu panjang gelombang khusus yang telah diatur oleh pengguna instrumen. Namun, ada juga spektrofotometer yang dapat membaca seluruh *range* UV-VIS. Spektrofotometer baru biasanya sudah bisa dikontrol menggunakan komputer dan memberikan fleksibilitas kepada pengguna seperti pembuatan kurva kalibrasi untuk menentukan konsentrasi senyawa *unknown*.

Spektrofotometer UV-VIS *single beam* bekerja pada prinsip umum yang sama, namun cara kerjanya adalah dengan mengukur absorbansi blanko terlebih dahulu, lalu kemudian diikuti oleh pengukuran sampel. Spektrofotometer jenis ini dapat mengukur absorbansi pada seluruh *range* UV-VIS maupun pada panjang gelombang tertentu. Skema kerja spektrofotometer UV-Vis *single beam* dapat dilihat pada Gambar 2.6.

Detektor mengukur intensitas cahaya yang diteruskan melewati sel blanko (I_0) dan dibandingkan dengan intensitas cahaya yang diteruskan melewati sel sampel (I). Absorbansi (A) kemudian dihitung melalui hubungan kedua intensitas tersebut seperti yang ditunjukkan pada persamaan (2.1) :

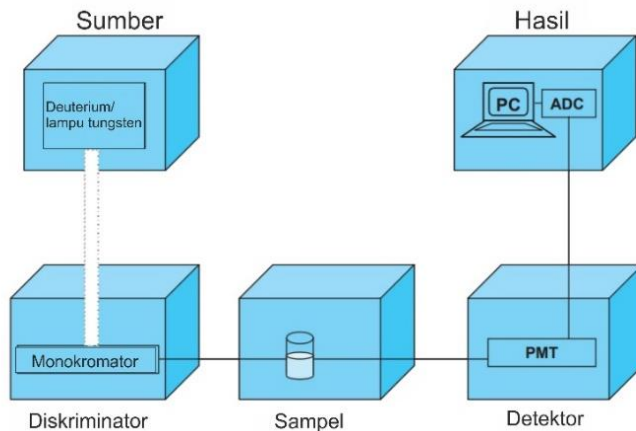
$$A = \log_{10} \frac{I_0}{I} \quad (2.1)$$

Spektra absorpsi biasanya merupakan plot antara absorbansi terhadap panjang gelombang. Pada absorpsi spektrofotometer UV-Vis, konsentrasi sampel berhubungan dengan absorbansi dan dapat

dihitung dengan hukum *Lambert-Beer* yang ditunjukkan pada persamaan (2.2)

$$A = \epsilon \cdot b \cdot c \quad (2.2)$$

Dimana A = absorbansi pada panjang gelombang tertentu, ϵ = koevisien ekstingsi, b = tebal sel, dan c = konsentrasi sampel. Biasanya, nilai ϵ dan b merupakan nilai yang konstan, sehingga absorbansi berbanding lurus dengan konsentrasi (McMahon, 2007).



Gambar 2.6 Skema Kerja Spektrofotometer UV-Vis Single Beam (McMahon, 2007).

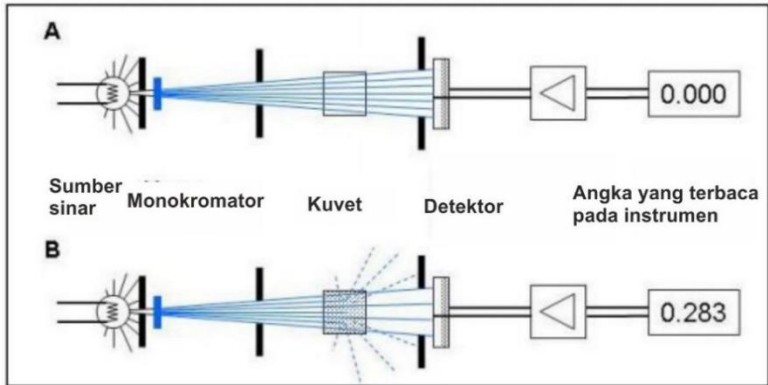
2.5.1.1 Turbidimetri

Kekeruhan atau turbiditas mengacu pada ciri-ciri spektra dispersi yang khas dan dapat diartikan sebagai perbandingan cahaya yang dipantulkan dengan cahaya yang ditembakkan. Intensitas cahaya yang dipantulkan oleh suspensi merupakan fungsi konsentrasi apabila kondisi lain bersifat konstan. Turbidimetri merupakan pengukuran cahaya yang ditransmisikan dan secara langsung, sebanding dengan konsentrasi serta kedalaman dispersi. Prinsip kerja spektroskopi absorpsi dapat digunakan pada turbidimetri dimana dilakukan

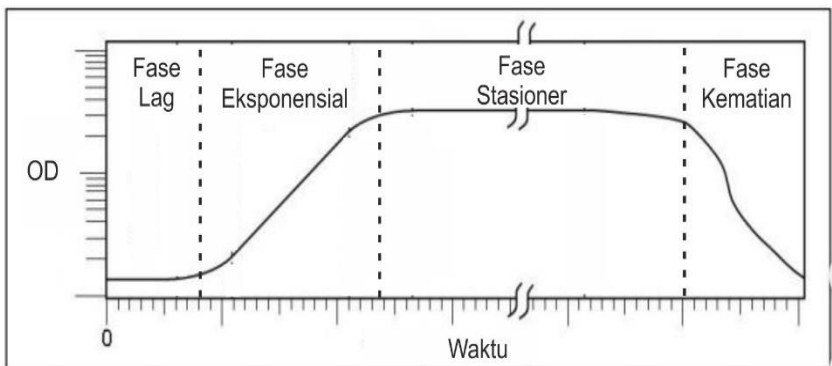
pengukuran absorpsi yang disebabkan oleh partikel tersuspensi pada sampel. Sehingga instrumen yang digunakan untuk spektroskopi absorpsi dapat digunakan untuk pengukuran turbiditas (Khopkar, 1998).

Turbidimetri merupakan salah satu metode yang digunakan pada pengukuran bakteri yang relatif lebih mudah dan cepat dibandingkan dengan metode lainnya. Metode turbidimetri merupakan metode yang paling sering digunakan untuk membuat kurva pertumbuhan bakteri. Pengukuran turbiditas media dilakukan pada panjang gelombang 600 nm dan biasanya disebut dengan OD₆₀₀ (OD = *optical density*) Beberapa metode lain seperti pengukuran berat kering dan kandungan nitrogen atau protein juga tidak terlalu sulit untuk dilakukan, namun membutuhkan waktu pengerjaan yang lebih lama dibandingkan dengan metode turbidimetri. Pengukuran turbiditas dilakukan pada media yang berisi bakteri dan dibandingkan dengan blanko (media tanpa bakteri). Prinsip kerja yang diterapkan adalah sebagian besar cahaya yang melewati kuvet akan terhambur dikarenakan sel-sel bakteri dalam kuvet. Penghamburan cahaya ini akan menurunkan intensitas cahaya yang diterima oleh detektor dan kemudian dinotasikan sebagai sebuah nilai (Widdel, 2010). Ilustrasi prinsip kerja pengukuran turbiditas media pertumbuhan bakteri dapat dilihat pada Gambar 2.7

Kurva pertumbuhan bakteri merupakan suatu plot kurva antara OD₆₀₀ dengan waktu. Kurva yang dihasilkan tidak hanya menghasilkan garis lurus, namun memiliki bentuk yang sedikit rumit. Pola kurva pertumbuhan bakteri ditunjukkan pada Gambar 2.8



Gambar 2.7 Ilustrasi Pengukuran Turbiditas pada Media Pertumbuhan Bakteri (Widdel, 2010).



Gambar 2.8 Pola Kurva Pertumbuhan Bakteri (Widdel, 2010).

Gambar 2.8 menunjukkan ada beberapa fase pada pertumbuhan bakteri, yaitu fase lag, fase eksponensial, fase stasioner, dan fase kematian. Fase lag merupakan fase pertama dalam kurva pertumbuhan bakteri. Pada fase lag merupakan fase dimana pertumbuhan bakteri masih belum bisa diamati atau dianggap belum terjadi pertumbuhan pada bakteri. Hal ini dikarenakan bakteri mengalami adaptasi fisik dengan kondisi media yang digunakan.

Setelah fase lag ini, bakteri mengalami pertumbuhan yang sangat pesat. Pada fase eksponensial, peningkatan sel dalam kultur sebanding dengan jumlah sel yang ada pada waktu tersebut. Setelah fase eksponensial, terjadi fase stasioner pada kurva pertumbuhan. Fase stasioner terjadi karena nutrisi yang ada pada media mulai berkurang sehingga terjadi kompetisi untuk mendapatkan nutrisi dan menyebabkan sebagian bakteri mati. Jumlah bakteri yang mati akan sebanding dengan pertumbuhannya sehingga pada fase ini akan terlihat seperti tidak terjadi pertumbuhan. Alasan lain yang menyebabkan terjadinya fase ini adalah dikarenakan bakteri mulai memproduksi hasil samping atau metabolit yang mencapai kadar tertentu dan berakibat menghambat pertumbuhan bakteri dalam media. Fase terakhir dalam kurva pertumbuhan adalah fase kematian. Fase ini ditandai dengan berkurangnya turbiditas media pertumbuhan bakteri yang signifikan. Nutrisi yang terkandung pada media semakin berkurang sehingga kompetisi untuk mendapatkan nutrisi semakin ketat. Selain itu, hasil samping metabolit yang bersifat racun juga semakin banyak terkandung dalam media dan menghambat pertumbuhan bakteri. Sebenarnya pada fase kematian masih ada sel bakteri yang mengalami pertumbuhan, namun jumlahnya sangat sedikit dan sebagian besar bakteri mengalami kematian. Sehingga pertumbuhan bakteri tidak terdeteksi dan menyebabkan penurunan pada kurva pertumbuhan dan dianggap terjadi pengurangan jumlah bakteri pada media (Maier, 2009).

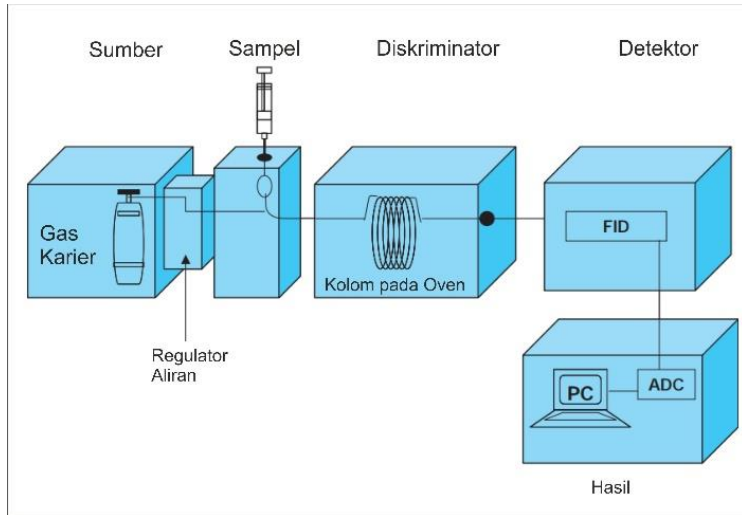
2.5.2 Kromatografi Gas

Kromatografi gas merupakan instrumen yang digunakan untuk analisis sampel cair yang mudah menguap. Pada gas kromatografi sampel diuapkan dan disuntikkan pada kolom kromatografi. Sampel dilewatkan melewati kolom dengan aliran gas inert. Kolom pada gas kromatografi berisi fasa stasioner, bisa berupa cair maupun padat. Pergerakan molekul pada kolom tergantung pada kekuatan adsorpsi

atau distribusi, dimana hal ini juga bergantung pada jenis molekul dan kolom yang digunakan. Senyawa diidentifikasi berdasarkan urutan senyawa yang keluar dari kolom dan berdasarkan waktu tinggal senyawa tersebut pada kolom. Pada kromatografi gas, suhu merupakan salah satu kondisi yang sangat diperhatikan karena suhu akan mempengaruhi adsorpsi molecular dan pergerakan molekul pada kolom. Kromatografi gas memiliki beberapa jenis detektor. Detektor yang secara universal adalah *Thermal Conductivity Detector* (TCD) dan yang paling banyak digunakan adalah *Flame Ionisation Detector* (FID).

Kromatografi gas memiliki beberapa komponen utama, yaitu sumber karier gas (fase gerak), regulator aliran, kolom, detektor, dan perangkat komputer yang terhubung dengan kromatografi gas. Skema kerja kromatografi gas dapat dilihat pada Gambar 2.9.

Data yang didapatkan dari instrumen kromatografi gas adalah sebuah kromatogram dengan puncak pada waktu retensi tertentu sesuai dengan senyawa yang terkandung pada sampel. Kromatografi gas dapat digunakan sebagai teknik kualitatif maupun kuantitatif untuk mengetahui kandungan suatu senyawa. Identifikasi kualitatif suatu senyawa dapat dilihat dari perbandingan waktu retensi sampel dengan standar. Sementara untuk uji kuantitatif, kromatografi gas dapat menggunakan standar internal atau eksternal untuk membuat kurva standar. Kemudian luas puncak sampel pada kromatogram dapat digunakan untuk mengetahui konsentrasi (McMahon, 2007).

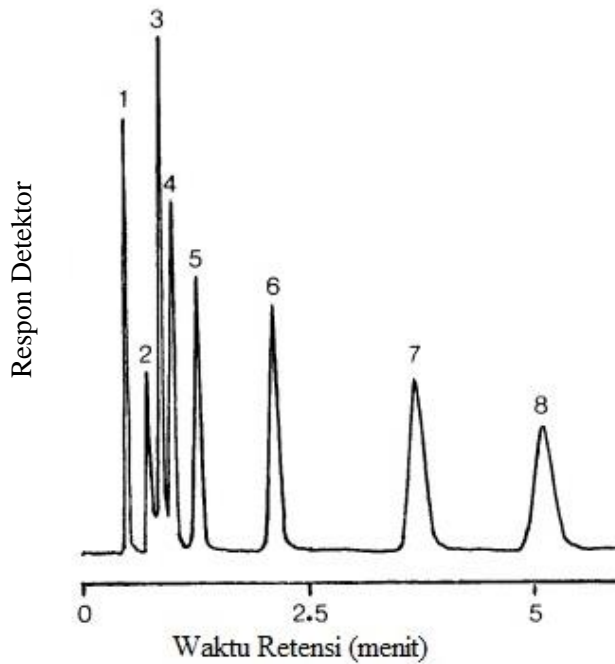


Gambar 2.9 Skema Kerja Kromatografi Gas (McMahon, 2007).

Penentuan konsentrasi sampel juga dapat dilakukan dengan membandingkan luas puncak sampel dengan luas puncak standar eksternal yang sudah diketahui konsentrasinya seperti yang ditunjukkan pada persamaan (2.3)

$$C_{\text{sampel}} = C_{\text{standar}} \times \frac{A_{\text{sampel}}}{A_{\text{standar}}} \quad (2.3)$$

Dimana C_{sampel} adalah konsentrasi sampel, C_{standar} merupakan konsentrasi standar eksternal, A_{sampel} dan A_{standar} adalah luas puncak sampel dan standar pada kromatogram (Guiochon dan Guillemin, 1988). Contoh kromatogram dari beberapa senyawa ditunjukkan pada Gambar 2.10.



Gambar 2.10 Kromatogram senyawa campuran asetaldehid (1), metanol (2), aseton (3), etanol (4), isopropanol (5), n-propanol (6), isobutanol (7), dan n-butanol (8) (Tangerman, 1997).

“Halaman Ini Sengaja Dikosongkan”

BAB III

METODOLOGI

3.1 Alat dan Bahan

3.1.1. Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah *autoclave* Tomy ES-315, tabung falcon, *laminar air flow*, *centrifuge* Thermo IEC CL40R, *incubator shaker* New Brunswick Scientific Excella E25, oven, vortex Thermo Maxi Mix II, Spektrofotometer UV-Vis Thermo Scientific Genesys 10S UV-Vis, Kromatografi Gas Hewlett Packard 5890 Series II, destilator, neraca analitik, pH-meter, serta peralatan tambahan lain yang lazim digunakan dalam laboratorium.

3.1.2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *Zymomonas mobilis* dari Laboratorium Kimia Mikroorganisme Departemen Kimia FIA ITS, *Saccharomyces cerevisiae* dari ragi roti komersial (Fermipan), nutrient agar (Merck), KH_2PO_4 (SAP Chemicals, kemurnian 99 %), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (SAP Chemicals, kemurnian 99 %), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (SAP Chemicals, kemurnian 99 %), Glukosa (SAP Chemicals), H_2SO_4 (SAP Chemicals, kemurnian 98 %), Fenol, *Yeast Extract* (Himedia), eceng gondok yang didapatkan dari perairan sekitar ITS, kertas saring, dan aquades.

Media yang digunakan untuk starter dan kurva pertumbuhan (media kompleks) terdiri atas KH_2PO_4 1,0 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,0 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g/L, *yeast extract* 5 g/L, dan glukosa 100 g/L.

Media yang digunakan untuk fermentasi terdiri atas KH_2PO_4 1,0 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,0 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g/L, dan hidrolisat eceng gondok dengan pH $5,2 \pm 0,1$.

3.2 Prosedur Kerja

3.2.1 Penentuan Kurva Standar Gula Reduksi Secara Spektrofotometri

Kurva standar dibuat menggunakan larutan glukosa dengan konsentrasi sebesar 20, 30, 40, 50, 60, dan 80 ppm dengan pelarut aquades. Kadar glukosa diukur dengan menggunakan metode Dubois *et al.* (1956).

3.2.2 Regenerasi Bakteri

Bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *Zymomonas mobilis*. Bakteri tersebut diperoleh dari koleksi bakteri Laboratorium Kimia Mikroorganisme Departemen Kimia FIA ITS. Bakteri diambil dengan ose dan diinokulasikan ke dalam cawan petri yang berisi medium agar NA dan diinkubasi pada suhu 30 °C selama 24 jam. *Zymomonas mobilis* pada media NA ini menjadi stok kultur baru (Maisaroh, 2009).

3.2.3 Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri

Kurva pertumbuhan bakteri dibuat untuk bakteri yang telah diregenerasi. Bakteri yang telah diregenerasi diambil sebanyak satu ose dan diinokulasikan ke dalam 20 mL media kompleks sebagai starter awal. Kultur tersebut diinkubasi pada suhu 30 °C selama 24 jam dalam kondisi *dishake* dengan kecepatan 120 rpm. Sebanyak 1 mL kultur dimasukkan kedalam 500 mL media kompleks dan diinkubasi pada suhu 30 °C dalam kondisi *dishake* dengan kecepatan 180 rpm. Selama inkubasi, pertumbuhan bakteri diamati dengan cara mengukur optikal densitasnya pada panjang gelombang 600 nm (OD_{600}) setiap jam (Awwalurrizki, 2009).

3.2.4 Preparasi Biomassa Eceng Gondok

Eceng gondok yang digunakan pada penelitian ini adalah eceng gondok yang tumbuh di perairan sekitar ITS. Tanaman eceng gondok kemudian dibersihkan menggunakan air hingga kotoran maupun lendir yang menempel hilang. Tanaman eceng gondok yang telah bersih kemudian dipotong kecil-kecil dan dijemur dibawah sinar matahari hingga kandungan airnya berkurang. Supaya tanaman eceng gondok lebih kering, maka dilakukan eceng gondok dioven dengan suhu 50 °C hingga massanya konstan. Tanaman eceng gondok yang telah kering kemudian diblender hingga berbentuk serbuk halus.

3.2.5 Hidrolisis Biomassa Eceng Gondok dengan Asam Encer

Bubuk daun dan batang eceng gondok diambil sebanyak masing 10 g, dimasukkan ke dalam Erlenmeyer kemudian ditambahkan dengan H₂SO₄ 5 % sebanyak 200 mL (komposisi campuran dalam erlenmeyer 10 % (w/v)). Mulut Erlenmeyer ditutup dengan aluminium foil hingga rapat dan campuran dipanaskan pada *autoclave* dengan suhu 121 °C selama 1 jam (Harun *et al.*, 2011). Campuran yang telah dipanaskan ini kemudian disaring dan didapatkan hidrolisat eceng gondok yang memiliki pH 0. Hidrolisat eceng gondok kemudian diatur pHnya hingga mencapai 5,2 ± 0,1 menggunakan larutan NaOH.

3.2.6 Pembuatan Stok Kultur

Medium cair dibuat dengan komposisi 1 g/L KH₂PO₄, 1 g/L (NH₄)₂SO₄, 0,5 g/L MgSO₄.7H₂O, 5 g/L *yeast extract*, dan 100 g/L glukosa. Media cair dibuat menggunakan pelarut aquades sebanyak 20 mL dan kemudian disterilkan menggunakan *autoclave* pada suhu 121 °C selama 15 menit. Satu ose biakan *Z. mobilis* diinokulasikan ke dalam media cair. Inokulasi dilakukan dalam keadaan steril pada

laminar air flow. Inokulum 20 mL diinkubasi dalam *incubator shaker* pada suhu 30°C dengan pengocokan 120 rpm selama 24 jam. Sebanyak 1 mL inokulum tersebut diinokulasikan kembali ke dalam medium baru dengan volume 200 mL dan diinkubasikan seperti proses sebelumnya (Maisaroh, 2009).

Pembuatan stok kultur *S. cerevisiae* dilakukan dengan membuat 100 mL media cair yang kemudian disterilkan dengan *autoclave* pada suhu 121 °C selama 15 menit. Media yang telah disterilkan kemudian ditambahkan dengan 1 g ragi roti Fermipan yang mengandung *S. cerevisiae* dan diinkubasi pada *incubator shaker* selama 24 jam pada suhu 30 °C dengan kecepatan pengocokan sebesar 120 rpm (Ndaba *et al.*, 2014).

3.2.7 Pembuatan Media Fermentasi

Media fermentasi dibuat sebanyak 200 mL untuk setiap erlenmeyer. Sebanyak 200 mL hidrolisat eceng gondok yang telah diatur pH nya ditambahkan dengan KH_2PO_4 1,0 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,0 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g/L (Tanaka *et al.*, 1999). Kemudian media fermentasi disterilkan menggunakan *autoclave* pada suhu 121 °C selama 15 menit.

3.2.8 Fermentasi Hidrolisat Eceng Gondok

Fermentasi dilakukan menggunakan bakteri *Zymomonas mobilis* dan ragi roti yang mengandung *Saccharomyces* yang sebelumnya telah diinkubasi pada media kompleks selama 24 jam dan kemudian disentrifugasi untuk diambil biomassa mikroorganismenya. Media fermentasi sebanyak 200 mL pada erlenmeyer ditambahkan dengan 5 g/L bakteri *Z. mobilis* dan 10 g/L *S. cerevisiae* (Ndaba *et al.*, 2014). Fermentasi ini dilakukan pada inkubator shaker 90 rpm. Fermentasi dilakukan dengan variasi waktu 12, 24, 36, dan 48 jam kemudian disentrifugasi dan diambil filtratnya. Sampel filtrat hasil

fermentasi diuji kandungan residu glukosanya. Filtrat hasil fermentasi kemudian didestilasi pada suhu 78 – 80 °C. Filtrat hasil destilasi yang didapatkan diuji kadar etanolnya menggunakan GC.

3.3 Metode Analisa

3.3.1 Analisa Kandungan Glukosa dengan Metode Dubois *et al.*

Analisa kandungan glukosa pada hidrolisat dan sampel dilakukan dengan metode yang dilakukan oleh Dubois *et al.* pada tahun 1956. Sebanyak 1 mL larutan sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Sampel ditambahkan dengan larutan fenol 5% dan dikocok. Tabung reaksi direndam dalam air dan ditambahkan 5 mL larutan asam sulfat pekat (98%) dengan cepat. Tabung reaksi dikocok hingga campuran homogen dan didiamkan selama 10 menit. Diukur absorbansi larutan dengan instrumen spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 490 nm.

3.3.2 Analisa Kadar Etanol

Cairan hasil fermentasi disentrifugasi pada 3000 rpm selama 15 menit. Filtrat hasil senstrifugasi kemudian didestilasi pada suhu 78-80°C. kadar etanol dalam destilat dianalisis dengan kromatografi gas HP-5890 Series II kolom CP9076, detektor FID *initial flow* 15 mL/menit. Suhu inlet 250 °C, suhu oven awal 100 °C dan maksimum 150 °C dengan laju pemanasan 10 °C/menit. Waktu retensi etanol 0,3 menit.

“ Halaman ini sengaja dikosongkan ”

BAB IV PEMBAHASAN

4.1. Regenerasi Bakteri *Zymomonas mobilis*

Bakteri *Z. mobilis* adalah salah satu bakteri Gram-negatif dan bersifat anaerobik fakultatif. Bakteri ini dapat memfermentasi glukosa dan fruktosa, menghasilkan etanol. Bakteri ini memiliki ciri-ciri koloni berwarna putih-krem (Yanase, 2014).

Sebelum digunakan, perlu dilakukan regenerasi bakteri *Z. mobilis* pada media padat *nutrient agar* (NA) untuk meremajakan umur bakteri. *Nutrient agar* merupakan media padat yang mengandung sumber nutrisi untuk pertumbuhan bakteri seperti pepton, ekstrak daging, dan bubuk agar. Gambar regenerasi bakteri *Z. mobilis* dalam media agar cawan petri ditunjukkan pada Gambar 4.1.



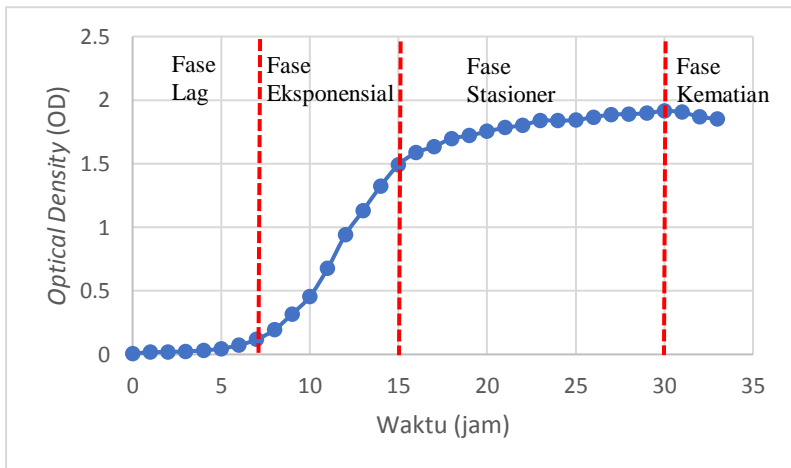
Gambar 4.1 Regenerasi Bakteri *Z. mobilis* pada Media Agar Cawan Petri.

4.2. Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri *Z. mobilis*

Pada penelitian ini, kurva pertumbuhan diperlukan untuk mengetahui fase log atau eksponensial bakteri *Z. mobilis*. Dengan mengetahui fase eksponensialnya, maka dapat diketahui umur bakteri

yang paling optimum untuk dijadikan inokulum dalam proses fermentasi.

Pengukuran jumlah bakteri secara tidak langsung dapat menggunakan cara pengukuran turbiditas atau *Optical Density* (OD) cairan medium tumbuh menggunakan spektrofotometer. Unit OD sebanding dengan massa sel dan jumlah bakteri yang tumbuh. Meningkatnya OD dalam media menunjukkan bahwa media cair semakin keruh dikarenakan semakin banyak bakteri yang tumbuh. Absorbansi atau OD yang terbaca merupakan sinar yang telah diteruskan setelah melewati kuvet sampel media pertumbuhan bakteri. Media yang digunakan pada saat pembuatan kurva pertumbuhan bakteri *Z. mobilis* adalah media kompleks. Kurva pertumbuhan *Z. mobilis* pada media kompleks dapat dilihat pada Gambar 4.2



Gambar 4.2 Kurva Pertumbuhan *Z. mobilis* pada Media Kompleks.

Dari kurva pertumbuhan *Z. mobilis* yang ditunjukkan pada Gambar 4.2, dapat dilihat bahwa terjadi fase lag pada 7 jam pertama. Pada fase ini, tidak terjadi pertumbuhan yang signifikan pada bakteri

dan jumlahnya cenderung tetap karena belum mengalami pembelahan. Pada fase ini, terjadi adaptasi bakteri terhadap lingkungan atau media yang menyebabkan selnya mengalami perubahan komposisi kimawi dan ukuran serta bertambahnya substansi intraseluler yang merupakan persiapan bakteri sebelum membelah diri.

Setelah fase lag akan terjadi fase eksponensial dimana pada fase ini bakteri mengalami pembelahan diri dengan laju konstan, massa menjadi dua kali lipat, dan keadaan pertumbuhan menjadi seimbang. Fase log dimulai sejak jam ke-8 hingga mencapai puncak pada jam ke-15.

Mulai jam ke-15 hingga jam ke-30, bakteri tidak lagi mengalami pertumbuhan yang signifikan dan cenderung konstan. Fase ini disebut dengan fase stasioner. Pada fase ini terjadi penumpukan hasil metabolisme sel yang dapat menjadi racun bagi bakteri. Selain itu, sumber nutrisi yang ada pada media juga sudah mulai habis sehingga terjadi kompetisi antar sel bakteri untuk mendapatkan sumber nutrisi yang menyebabkan sebagian sel mati dan sebagian sel lainnya tetap tumbuh. Dengan begitu jumlah sel yang ada pada media menjadi tetap.

Fase terakhir yang terjadi pada kurva pertumbuhan adalah fase *death* atau kematian dimana pada fase ini, racun hasil metabolisme bakteri semakin banyak menumpuk pada media dan sumber nutrisi media mulai habis. Pada fase ini, OD akan menurun karena sebagian besar bakteri mati kekurangan nutrisi dan hanya sebagian kecil bakteri yang mampu bertahan hidup. Fase kematian pada kurva pertumbuhan Gambar 4.2 dimulai pada jam ke-31 hingga jam ke-33.

4.3. Pembuatan Kurva Standar Glukosa Secara Spektrofotometri

Penentuan kurva standar glukosa bertujuan untuk menentukan persamaan yang nantinya akan digunakan untuk menghitung kadar

glukosa yang terkandung dalam hidrolisat eceng gondok dan kadar glukosa yang tersisa pada sampel setelah mengalami proses fermentasi. Larutan standar glukosa dibuat dengan cara membuat larutan glukosa 1000 ppm yang kemudian diencerkan dengan pelarut aquades sehingga didapatkan beberapa variasi konsentrasi, yaitu 0, 10, 20, 30, 40, 50, dan 60 ppm. Metode yang digunakan pada pembuatan kurva standar glukosa ini merujuk pada metode yang telah dilakukan oleh Dubois *et al.* pada tahun 1956. Masing-masing larutan dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 1 mL. Larutan ditambahkan dengan larutan fenol 5% dan H₂SO₄ 98% lalu dikocok hingga homogen. Penambahan H₂SO₄ menyebabkan glukosa terhidrasi menjadi senyawa hidroksimetil furfural. Senyawa ini kemudian bereaksi dengan fenol dan menghasilkan senyawa berwarna gelap (Cui dan Brummer, 2005). Tabung reaksi lalu direndam dalam air selama 10 menit dan diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 490 nm.

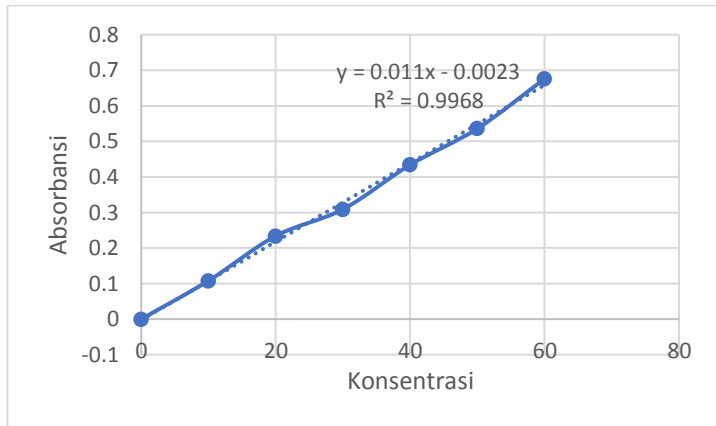
Kurva standar glukosa dibuat dengan membuat plot grafik nilai absorbansi terhadap konsentrasi larutan hingga didapatkan sebuah garis lurus dengan persamaan seperti yang ditunjukkan pada Gambar 4.3.

Dari Grafik yang ditunjukkan oleh Gambar 4.3, dapat dilihat bahwa nilai absorbansi meningkat sejalan dengan besarnya nilai konsentrasi glukosa. Hal ini sesuai dengan Hukum Lambert-Beer yang menyatakan bahwa hubungan $A = \epsilon \cdot b \cdot c$. Dari kurva tersebut didapatkan persamaan kurva, yaitu :

$$y = 0,011x - 0,0023 \quad (4.1)$$

Untuk menguji keabsahan kurva standar yang telah didapatkan, maka dilakukan uji kelinieran kurva dengan menentukan nilai koefisien korelasi (R^2) dimana R^2 merupakan ukuran kesempurnaan hubungan antara konsentrasi dengan absorbansi larutan standar. Nilai R^2 yang baik adalah nilai yang mendekati +1 atau -1 sedangkan nilai 0 menyatakan tidak adanya korelasi antara kedua variabel yang diamati.

Nilai R^2 dari kurva standar glukosa pada Gambar 4.3 adalah 0,9968. Nilai ini mendekati +1 dan menunjukkan bahwa kurva standar memiliki kelinearan yang baik.

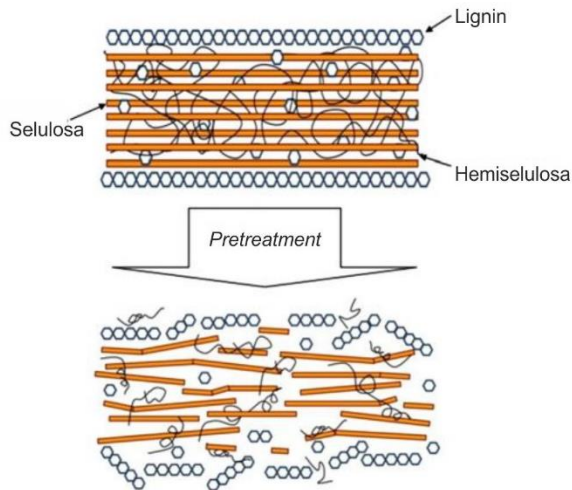


Gambar 4.3 Kurva Standar Glukosa.

4.4. Hidrolisis Eceng Gondok

Proses hidrolisis eceng gondok dilakukan untuk memecah selulosa yang merupakan kandungan utama eceng gondok menjadi glukosa yang kemudian bisa diubah menjadi etanol dengan proses fermentasi oleh mikroorganisme. Proses pertama yang dilakukan sebelum hidrolisis adalah *pretreatment* fisik eceng gondok. Proses *pretreatment* fisik yang dilakukan adalah dengan cara mengeringkan eceng gondok hingga massanya konstan. Setelah kering, eceng gondok diblender hingga menjadi bubuk kering yang halus. *Pretreatment* fisik pada eceng gondok dilakukan untuk meningkatkan luas permukaan, mengurangi ukuran partikel sampel (Harun *et al.*, 2011), dan mempermudah penetrasi asam ke dalam sampel (Sun dan Cheng, 2002). Selain itu, *pretreatment* fisik juga menyebabkan berkurangnya derajat polimerisasi dan dekrystalisasi material lignoselulosa (Mood *et al.*, 2013). Ilustrasi pengaruh proses

pretreatment pada material lignoselulosa dapat dilihat pada Gambar 4.3



Gambar 4.4 Ilustrasi Pengaruh *Pretreatment* pada Material Lignoselulosa.

Adanya proses *pretreatment* pada biomassa eceng gondok akan mempermudah kontak antara selulosa dengan agen penghidrolisis serta mempermudah pecahnya selulosa menjadi glukosa. Selain itu, proses pengeringan eceng gondok menyebabkan tingkat difusivitas yang tinggi pada bahan kering dan pengurangan kandungan air yang mencegah pengenceran asam saat masuk ke dalam sampel (Harun *et al.*, 2011) Bubuk eceng gondok kering ditunjukkan pada Gambar 4.4



Gambar 4.5 Bubuk Eceng Gondok Kering a.) Bubuk Daun Eceng Gondok; b.) Bubuk Batang Eceng Gondok.

Setelah proses *pretreatment*, dilakukan proses hidrolisis bubuk eceng gondok. Hidrolisis yang dilakukan pada penelitian ini adalah hidrolisis asam encer dengan menggunakan asam H_2SO_4 5 % (v/v). Asam merupakan senyawa yang mampu menghidrolisis material lignoselulosa dengan baik. Asam dapat menembus lignin dengan baik walaupun tanpa proses *pretreatment*. Asam juga dapat menghidrolisis lignoselulosa lebih cepat daripada enzim (Cheung dan Anderson, 1996). Pada penelitian ini, hidrolisis dilakukan pada campuran serbuk eceng gondok daun dan batang dengan perbandingan komposisi 1 : 1. Bubuk daun dicampur dengan serbuk batang eceng gondok bertujuan supaya kadar glukosa yang dihasilkan bisa lebih tinggi. Campuran bubuk eceng gondok dihidrolisis dengan menggunakan perbandingan 10% (w bubuk eceng gondok / V H_2SO_4) pada suhu 121°C selama 1 jam. Setelah dihidrolisis, campuran disaring dan filtrat diambil untuk kemudian diatur hingga pH nya bernilai $5,2 \pm 0,1$ menggunakan NaOH. Pengaturan pH disesuaikan dengan kondisi optimum mikroorganisme supaya dapat tumbuh dengan baik dan proses fermentasi bisa berjalan dengan baik. Hasil hidrolisis bubuk eceng gondok menghasilkan larutan yang berwarna coklat dan setelah

ditambahkan NaOH warna larutan akan berubah menjadi coklat kehitaman. Hidrolisat yang telah diatur pH nya kemudian diukur kadar glukosanya dengan metode Dubois *et al.* menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Kadar glukosa yang terkandung pada hidrolisat adalah 14,5 g / L atau 0,29 g / g bubuk kering eceng gondok. Hasil ini menunjukkan kandungan glukosa yang lebih tinggi apabila dibandingkan dengan penelitian Harun *et al.* (2011) yang menghasilkan gula dengan kadar 0,16 g / g bubuk kering eceng gondok. Hidrolisat yang telah diketahui kadar glukosanya ini kemudian di tambahkan nutrien sebelum digunakan sebagai media fermentasi.

4.5. Fermentasi Hidrolisat Eceng Gondok dengan Kultur Campuran *Z. mobilis* dan *S. cerevisiae*

4.5.1. Pembuatan Media Fermentasi dari Hidrolisat Eceng Gondok

Media fermentasi dibuat dengan menggunakan hidrolisat eceng gondok yang ditambahkan dengan $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, dan KH_2PO_4 . Penambahan senyawa ini berguna sebagai nutrien untuk mendukung pertumbuhan mikroorganisme selain glukosa yang telah terkandung pada hidrolisat eceng gondok. Penambahan nutrien-nutrien tersebut memiliki fungsi yang berbeda bagi mikroorganisme. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ berfungsi sebagai penyedia nitrogen yang berguna untuk pembentukan asam-asam nukleat dan asam-asam amino. Sementara penambahan KH_2PO_4 berfungsi sebagai penyedia kalium yang berguna sebagai kofaktor enzim. Sedangkan $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ mengandung magnesium yang berfungsi sebagai kofaktor untuk berbagai enzim pada jalur ED. Selain itu, ion magnesium juga memiliki kemampuan untuk menjaga kestabilan permeabilitas membran luar sel, sehingga penambahan magnesium berguna untuk memulihkan sel *Z. mobilis* yang rusak karena adanya etanol dan mencegah kerusakan sel yang disebabkan oleh keluarnya senyawa

intermediet dari sel (Tanaka *et al.*, 1999). Media fermentasi ini kemudian disterilkan menggunakan *autoclave* untuk mematikan mikroorganisme yang mungkin terkandung pada media dan berpotensi mengganggu kinerja *Z. mobilis* dan *S. cerevisiae* dalam proses fermentasi.

4.5.2. Fermentasi Hidrolisat Eceng Gondok

Fermentasi merupakan proses yang memanfaatkan kemampuan mikroba untuk menghasilkan metabolit primer maupun sekunder pada lingkungan yang dikendalikan pada kondisi tertentu. Pada proses ini fermentasi dilakukan dengan menggunakan mikroorganisme *Z. mobilis* dan *S. cerevisiae*. *Z. mobilis* memiliki laju pertumbuhan yang tinggi serta tahan terhadap konsentrasi etanol hingga 16 % (Davis *et al.*, 2006). Sementara *S. cerevisiae* juga merupakan salah satu mikroorganisme penghasil etanol yang sudah banyak digunakan pada industri makanan atau minuman beralkohol. *S. cerevisiae* mampu bertahan hidup pada media dengan konsentrasi etanol hingga 15% (Stewart, 2014). Kultur campuran kedua mikroorganisme ini sudah terbukti dapat memberikan hasil etanol yang lebih tinggi dibandingkan menggunakan kultur tunggal (Ndaba *et al.*, 2014).

Fermentasi dilakukan dengan kondisi anaerob sehingga pengocokan dengan *shaker* dilakukan dengan kondisi yang pelan, yaitu 90 rpm. Hal ini bertujuan untuk menghomogenkan larutan sehingga bakteri tidak hanya mengendap pada dasar erlenmeyer dan proses fermentasi dapat berjalan dengan optimal. Fermentasi dilakukan pada empat variasi waktu, yaitu 12, 24, 36, dan 48 jam. Hasil fermentasi yang didapatkan diuji kadar glukosa sisa fermentasinya, kemudian didestilasi pada suhu 78 – 80 °C dan diuji kadar etanolnya dengan menggunakan GC.

Pengukuran kadar glukosa yang dilakukan setelah proses fermentasi bertujuan untuk mengetahui sisa glukosa yang terkandung pada sampel sehingga akan diketahui jumlah glukosa yang

terkonsumsi selama proses fermentasi. Dari data glukosa terkonsumsi, dapat dihitung jumlah etanol teoritis yang terbentuk. Proses fermentasi akan memberikan hasil bersih $2 \text{ etanol} + 2 \text{ CO}_2$. Melalui persamaan tersebut dapat disimpulkan bahwa apabila 1 g glukosa sebagai sumber karbon difermentasi akan menghasilkan 0,511 g etanol (El-mansi *et al.*, 2007). Jumlah glukosa yang terkonsumsi dan hasil etanol teoritis ditunjukkan pada Tabel 4.1

Tabel 4.1 Tabel Konsumsi Glukosa dan Hasil Etanol Teoritis.

Waktu Fermentasi (jam)	Glukosa Awal (g)	Glukosa Akhir (g)	Konsumsi Glukosa (g)
12	2,8968	1,7310	1,1658
24	2,8968	1,8408	1,0560
36	2,8968	1,4468	1,4500
48	2,8968	1,2560	1,6408

Hasil destilat yang didapatkan kemudian diuji menggunakan GC. Untuk mengetahui kadar etanol dalam sampel, digunakan perbandingan luas area sampel yang didapatkan dan luas area standar yang telah diketahui konsentrasinya. Rumus penentuan kadar etanol dalam destilat ditunjukkan pada persamaan (4.2) :

$$\% \text{etanol sampel} = \frac{A_{\text{Sampel}}}{A_{\text{Standar}}} \times \text{Konsentrasi Standar} \quad (4.2)$$

A_{Sampel} : Luas puncak Sampel

A_{Standar} : Luas puncak Standar

Standar yang digunakan pada GC adalah Etanol p.a. dengan konsentrasi 98 %. Hasil analisa GC standar etanol ditunjukkan pada lampiran. Dari hasil analisa yang dilakukan, diketahui bahwa puncak etanol 98 % muncul pada waktu retensi 0,395 menit dengan luas

puncak sebesar $4,15510 \times 10^6$. Kemudian dilakukan uji pada sampel hasil fermentasi 12, 24, 36, dan 48 jam (kromatogram ditunjukkan pada lembar lampiran). Melalui data kromatogram dapat diketahui luas area puncak dari masing-masing sampel untuk dihitung kadar etanol yang terbentuk pada sampel. Data luas area sampel dan perhitungan kadar etanol sampel ditunjukkan pada Tabel 4.2

Tabel 4.2 Kadar Etanol Sampel Hasil Fermentasi.

Sampel	Waktu Retensi	Area Sampel	%etanol
Standar Etanol	0,395	4,1551E+06	98,0000
Fermentasi 12 jam	0,397	1,1524E+05	2,7180
Fermentasi 24 jam	0,406	1,3524E+05	3,1897
Fermentasi 36 jam	0,381	1,7763E+05	4,1895
Fermentasi 48 jam	0,409	2,0447E+05	4,8225

Melalui data yang ditunjukkan oleh Tabel 4.2 terlihat bahwa semakin lama waktu fermentasi akan menghasilkan kadar etanol yang lebih tinggi. Kadar etanol tertinggi yang dihasilkan adalah pada sampel fermentasi 48 jam, yaitu sebesar 4,8225 %. Namun, kadar etanol yang dihasilkan pada penelitian ini terbilang kecil karena hanya berkisar antara 2 - 4,8 %. Hal ini bisa jadi disebabkan proses fermentasi yang kurang optimal karena menggunakan metode *batch*. Selain itu, media yang digunakan merupakan media dari hasil hidrolisis yang berbeda dengan media pada saat produksi biomassa, sehingga mikroorganisme akan mengalami penyesuaian dengan kondisi media yang baru. Proses hidrolisis dengan asam encer yang dilakukan sebelumnya memungkinkan terbentuknya inhibitor yang menghambat proses fermentasi seperti furfural, HMF (5-hidroksimetilfurfural), dan 2 furfuralaldehid. Terlebih lagi, pada suhu yang lebih tinggi, inhibitor

yang terbentuk dapat terdegradasi menjadi produk lain yang tidak diinginkan seperti asam format (Larsson *et al.*, 2000).

Melalui data kadar etanol pada Tabel 4.2, dapat diketahui massa etanol yang dihasilkan melalui proses fermentasi pada penelitian ini yang dihitung melalui persamaan berikut :

$$\text{Jumlah etanol (g)} = \% \text{ etanol} \times V \text{ destilat} \times \rho \text{ etanol} \quad (4.3)$$

$V \text{ destilat}$: Volume destilat (mL)

$\rho \text{ etanol}$: Massa jenis etanol (0,7893 g/mL)

massa etanol yang dihasilkan pada persamaan ini ditunjukkan pada Tabel 4.3

Tabel 4.3 Massa Etanol Sampel per Etanol Teoritis dari Konsumsi Glukosa

Waktu Fermentasi (jam)	%etanol	V Destilat (mL)	Hasil Etanol (g)
12	2,718	19,0	0,4076
24	3,1897	17,5	0,4406
36	4,1895	20,0	0,6614
48	4,8255	19,0	0,7237

Melalui Tabel 4.3 terlihat bahwa semakin lama waktu fermentasi, maka massa etanol yang dihasilkan semakin banyak. Namun, etanol yang dihasilkan dari penelitian ini masih lebih kecil apabila dibandingkan dengan glukosa yang dikonsumsi oleh bakteri. Hal ini bisa jadi dikarenakan oleh proses hidrolisis yang masih perlu dioptimalkan supaya inhibitor fermentasi yang terbentuk tidak begitu besar.

Yield etanol dapat dihitung dengan membandingkan massa etanol akhir dengan massa eceng gondok yang digunakan. *Yield* etanol secara keseluruhan ditunjukkan pada Tabel 4.4

Tabel 4.4 *Yield* Etanol dibandingkan dengan massa bubuk eceng gondok

Waktu Fermentasi (jam)	Hasil Etanol (g)	Bubuk eceng gondok (g)	<i>Yield</i> Keseluruhan (%)
12	0,41	20,00	2,04
24	0,44	20,00	2,20
36	0,66	20,00	3,31
48	0,72	20,00	3,62

Yield etanol yang ditunjukkan pada Tabel 4.4 juga memiliki prosentase yang sangat kecil, yaitu 2 – 3 %. Hal ini dikarenakan beberapa hal yang telah dijelaskan sebelumnya, yaitu kandungan media hasil hidrolisis serta metode fermentasi. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai proses detoksifikasi inhibitor serta optimasi metode hidrolisis sehingga dapat dihasilkan kadar serta *yield* etanol yang lebih tinggi.

“Halaman ini Sengaja Dikosongkan”

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian ini adalah selulosa dari tanaman eceng gondok dapat digunakan menjadi bahan baku produksi bioetanol dengan adanya proses hidrolisis bubuk eceng gondok kering menggunakan H_2SO_4 5 % dan fermentasi hidrolisat oleh campuran mikroorganisme *Z. mobilis* dan *S. cerevisiae*. Hidrolisis bubuk eceng gondok kering dapat menghasilkan glukosa hingga 14,5 g/L atau 0,29 g glukosa / g bubuk kering. Hidrolisat eceng gondok difermentasi pada suhu 30° C dengan pH 5,2±0,1 selama 12, 24, 36, dan 48 jam dan menghasilkan kadar etanol sebesar 2,7; 3,2; 4,2; dan 4,8 % dengan massa etanol yang dihasilkan sebesar 0,4076; 0,4406; 0,6614; 0,7237 g. Sementara *yield* etanol yang dihasilkan adalah 2,04; 2,20; 3,31; dan 3,62 %. Hasil etanol yang paling tinggi adalah pada fermentasi 48 jam dengan kadar etanol 4,8 %, massa etanol sebesar 0,7237 g, serta *yield* etanol keseluruhan sebesar 3,62 %.

5.2. Saran

Penelitian lebih lanjut diperlukan untuk mengetahui kondisi optimal pada proses hidrolisis supaya menghasilkan kadar glukosa yang lebih tinggi. Selain itu, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang analisa kandungan hidrolisat dan proses detoksifikasi senyawa yang dapat menghambat proses fermentasi.

“Halaman ini Sengaja Dikosongkan”

DAFTAR PUSTAKA

- Abate, C., Callieri, D., Rodriguez, E., Garro, O. (1996). Ethanol Production by a Mixed Culture of Flocculent Strains of *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces* sp. Applied Microbiology and Biotechnology. 45, 580-583.
- Anderson, J. R., Bendell, D. J., Groundwater, P. W. (2004). Organic Spectroscopic Analysis. Cambridge : Royal Society of Chemistry.
- Aniek, S. (2003). Kerajinan Tangan Enceng Gondok. Jawa Tengah: Balai Pengembangan Pendidikan Luar Sekolah dan Pemuda (BPPLSP)
- Anton Gerbono. (2005). Kerajinan Enceng Gondok, Yogyakarta: Kanisius.
- Awwalurizki, N. (2009). Hidrolisis Sukrosa dengan ENzim Invertase untuk Produksi Etanol Menggunakan *Zymomonas mobilis*. Skripsi Jurusan Kimia, Institut Teknologi Sepuluh Nopember.
- Behera, S., Mohanty, R. C., Ray, R. C. (2010). Comparative Study of Bioethanol Production from Mahula (*Madhuca latifolia* L.) Flowers by *Saccharomyces cerevisiae* and *Zymomonas mobilis*. Applied Energy. 87, 2352-2355.
- Bobleter, O. (1994). Hydrothermal Degradation of Polymers Derived from Plants. Progress in Polymer Science. 19, 797–841.
- Broder, J. D., Barrier, J. W., Lee, K. P., Bulls, M. M. (1995). Biofuels System Economics. World Resource Review. 7(4), 560-569.
- Brown, R. M. Jr. (2003). Cellulose Structure and Biosynthesis : What Is In Store for the 21st Century?. Journal of Polymer Science Part A : Polymer Chemistry. 42, 487-495.

- Chen, H. Z. (2014). *Biotechnology of Lignocellulose : Theory and Practice*. New York : Springer Science+Business Media.
- Cheung, S. dan Anderson, B. (1996). Ethanol Production from Wastewater Solids : *Water Environment and Technology*. 8 (5), 55–60
- Choi, G. W., Um, H. J., Kim, Y., Kang, H Y., Kim, M., Chung, B. W., Kim, Y. H. (2010). Isolation and Characterization of Two Soil Derived Yeasts for Bioethanol Production on Cassava Starch. *Biomass and Bioenergy*. 34, 1223-1231
- Das, A., Ghosh, P., Paul, T., Ghosh, U., Pati, B. R., Mondal, K. C. (2016). Production of Bioethanol as Useful Biofuel through the Conversion of Water Hyacinth (*Eicchornia crassipes*). *Biotech*. 6:70, 1-9.
- Davis, L., Rogers, P., Pearce, J., Peiris, P. (2006). Evaluation of Zymoonas-based Ethanol Production from a Hydrolysed Waste Starch Stream. *Biomass and Bioenergy*. 30, 809-814.
- Dawes, E. A., Ribbons, D. W., Large, P. J. (1966). The Route of Ethanol Formation in *Zymomonas mobilis*. *Biochemical Journal*. 98, 795–803.
- Demirbas, A. (2010). Use of Algae as Biofuel Sources. *Energy Conversion and Management*. 51 (12), 2738-2749.
- Faith, W. (1945). Development of the Scholler Process in the United States. *Industrial and Engineering Chemistry*. 37(1), 9-11.
- Fengel, D., Wegener, G., (1984). *Wood : Chemistry, Ultrastructure, Reactions*. Berlin : Walter de Gruyter & Co.
- Ganguly, A., Chatterjee, P. K., Dey, A. (2012). Studies on Ethanol Production from Water Hyacinth – A Review. *Renewable and Sustainable Energy Review*. 16, 966-972.
- Garrote, G., Dominguez, H., Parajo, J.C. (1999). Hydrothermal Processing of Lignocellulosic Materials. *European Journal of Wood and Wood Products*. 57, 191–202.

- Girio, F. M., Fonseca, C., Carvalheiro, F., Duarte, L. C., Marques, S., Bogel-Lukasik, R. (2010). Hemicelluloses for Fuel Ethanol: A Review. *Bioresource Technology*. 101, 4775–4800.
- Grabber, J.H. (2005). How Do Lignin Composition, Structure, and Cross-Linking Affect Degradability? A Review of Cell Wall Model Studies. *Crop Science*. 45, 820–831.
- Guiochon, G. dan Guillemin, C. L. (1988). *Journal of Chromatography Library*. New York : Elsevier Science Publishing Company Inc.
- Guragain, Y. N., Coninck, J. D., Husson, F., Durand, A., Rakshit, S. D. (2011). Comparison of Some New Pretreatment Methods for Second Generation Bioethanol Production from Wheat Straw and Water Hyacinth. *Bioresource Technology*. 102, 4416–4424.
- Harahap, A. S., Suhariyuwanto, Bambang, S. M. (2003). *Kerajinan Tangan Eceng Gondok. Proyek Pemberdayaan UPT dan Tenaga Kependidikan Luar Sekolah Jawa Tengah*.
- Harun, M. Y., Radiah, A. B. D., Abidin, Z. Z., Yunus, R. (2011). Effect of Physical Pretreatment on Dilute Acid Hydrolysis of Water Hyacinth (*Eichhornia crassipes*). *Bioresource Technology*. 102, 5193–5199.
- <https://plants.usda.gov/core/profile?symbol=EICHH> diakses pada tanggal 21 Maret 2018.
- Karimi, K., Kheradmandinia, S., dan Taherzadeh, M. J. (2006). Conversion of Rice Straw to Sugars by Dilute-acid Hydrolysis. *Biomass Bioenergy* 30(3), 247–253.
- Katzen, R., Madson, P. W., Monceaux, D. A. (1995). Use of Cellulosic Feedstock for Alcohol Production, pada Lyons, T. P., Murtagh, J. E., Kelsall, D. R., (ed.), *The Alcohol Textbook*. Nottingham University Press.
- Kementerian Negara Lingkungan Hidup. (2009). *Konservasi*

- Danau Limboto: Penuntun Praktis Pemanfaatan Eceng Gondok.
- Khopkar, S. M. (2004). Basic Concepts of Analytical Chemistry. New Delhi : New Age International (P) Ltd., Publisher.
- Kumar, P., Barret, D. M., Delwiche, M. J., Stroeve, P. (2009). Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. Industrial & Engineering Chemistry Research. 48(8), 3713– 3729.
- Laureano-Perez, L., Teymouri, F., Alizadeh, H., Dale, B. E. (2005). Understanding Factors that Limit Enzymatic Hydrolysis of Biomass: Characterization of Pretreated Corn Stover. Applied Biochemistry and Biotechnology. 121–124, 1081–1099.
- Letti, L. A. J., Karp, S. G., Woiciechowski, A. L., Soccol, C. R. (2012). Ethanol Production from Soybean Molasses by *Zymomonas mobilis*. Biomass and Bioenergy. 44, 80-86.
- Li, C., Knierim, B., Manisseri, C., Arora, R., Scheller, H. V., Auer, M., Vogel, K. P., Simmons, B. A., Singh, S. (2010). Comparison of Dilute Acid and Ionic Liquid Pretreatment Of Switchgrass : Biomass Recalcitrance, Delignification and Enzymatic Saccharification. Bioresource Technology. 101, 4900–4906.
- Li M. F., Fan, Y. M., Xu, F., Sun, R. C., Zhang, X. L. (2010). Cold Sodium Hydroxide/Urea Based Pretreatment of Bamboo for Bioethanol Production: Characterization of The Cellulose Rich Fraction. Industrial Crops and Products. 32, 551–559.
- Lora, E. E. S., Palacio, J. C. E., Rocha, M. H., Reno, M. L. G., Venturini, O. J., del Olmo, O. A. (2011). Issues to Consider, Existing Tools and Constraints in Biofuels Sustainability Assessments. Energy. 36 (4), 2097-2110.
- Maisaroh. 2009. Hidrolisis Selulosa Bagas dengan Enzim Selulase dari Bekicot (*Achatina fulica*) untuk Produksi Etanol

- menggunakan *Zymomonas mobilis* A3. Tesis Jurusan Kimia, Institut Teknologi Sepuluh Nopember..
- Manivannan, A., Jayarani, P. H., Narendhirakannan, R. T. (2012). Enhanced Acid Hydrolysis for Bioethanol Production from Water Hyacinth (*Eichhornia crassipes*) using Fermentating Yeast *Candida intermedia* NRRL Y-981. Journal of Scientific & Industrial Research. 71, 51-56.
- McMahon, G. (2007). Analytical Instrumentation : A Guide to Laboratory, Portable, and Miniaturized Instruments. England : John Wiley & Sons Ltd.
- Mood, S. H., Golfeshan, A. H., Tabatabaei, M., Jouzani, G. S., Najafi, G. H., Gholami, M., Ardjmand, M. (2013). Lignocellulosic Biomass to Bioethanol : a Comprehensive Review with a Focus on Pretreatment. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 27, 77-93.
- Ndaba, B., Chiyanzu, I., Marx, S., Obiero, G. (2014). Effect of *Saccharomyces cerevisiae* and *Zymomonas mobilis* on the Co-fermentation of Sweet Sorghum Bagasse Hydrolysate pretreated Under Varying Conditions. Biomass and Bioenergy. 71, 350-356.
- Park, J. M., Kim, P. G., Jang, J. H., Wang, Z., Hwang, B. S., DeVries, K. L. (2008). Interfacial Evaluation and Durability of Modified Jute Fibers / Polypropylene (PP) Composites using Micromechanical Test and Acoustic Emission. Composite : Part B. 39, 1042-1061.
- Qureshi, N., dan Manderson, G. (1995). Bioconversion of Renewable Resource into Ethanol : An Economic Evaluation of Selected Hydrolysis, Fermentation, and Membrane Technologies. Energy Sources. 17, 241-265.
- Rogers, P. L., Lee, K. J., Skotnickin, M. L., Tribe, D. E. (1982). Ethanol Production by *Zymomonas mobilis*. Australia : School of Biotechnology, University of New South Wales.

- Sambo, S., Faruk, U. Z., Shahida, A. A. (2015). Ethanol Production from Fresh and Dry Water Hyacinth Using Ruminant Microorganisms and Ethanol Producers. *Global Advanced Research Journal of Biotechnology*. 4 (1), 23-29.
- Sindhu, R., Binod, P., Pandey, A., Madhavan, A., Alphanosa, J. A., Vivek, N., Gnansounou, E., Castro, E., Faraco, V. (2017). Water Hyacinth A Potential Source for Value Addition : An Overview. *Bioresource Technology*. 230, 152-162
- Stewart, G.G. (2014). *SACCHAROMYCES – Saccharomyces cerevisiae*. Pada C. A. Batt (Ed.), *Encyclopedia of Food Microbiology* Second Edition. (p. 309-315). London, UK : Elsevier, Ltd.
- Sun, Y., Cheng, J. (2002). Hydrolysis of Lignocellulosic Materials for Ethanol Production: A Review. *Bioresource Technology*. 83, 1–11.
- Taherzadeh, M. J. dan Karimi, K. (2007). Acid-based Hydrolysis Processes for Ethanol from Lignocellulosic Materials : A Review. *BioResource*. 2 (3), 472-499
- Talebnia, F., Karakashev, D., Angelidaki, I. (2010). Production of Bioethanol from Wheat Straw: An Overview on Pretreatment, Hydrolysis and Fermentation. *Bioresource Technology*. 101(13), 4744-4753.
- Tanaka, K., Hilary, Z. D., Ishizaki, A. (1999). Investigation of Utility of Pineapple Juice and Pineapple Waste Material as Low-Cost Substrate for Ethanol Fermentation by *Zymomonas mobilis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 87(5), 642-646.
- Tangerman, A. (1997). Highly Sensitive Gas Chromatographic Analysis of Ethanol on Whole Blood, Serum, Urine, and Fecal Supernatants by the Direct Injection method. *Clinical Chemistry*. 1003-1009
- Widdel, F. (2010). *Theory and Measurement of Bacterial Growth*.

University of Bremen.

Wyman, C. E. (1996). Handbook on Bioethanol: Production and Utilization. Washington, DC: Taylor & Francis.

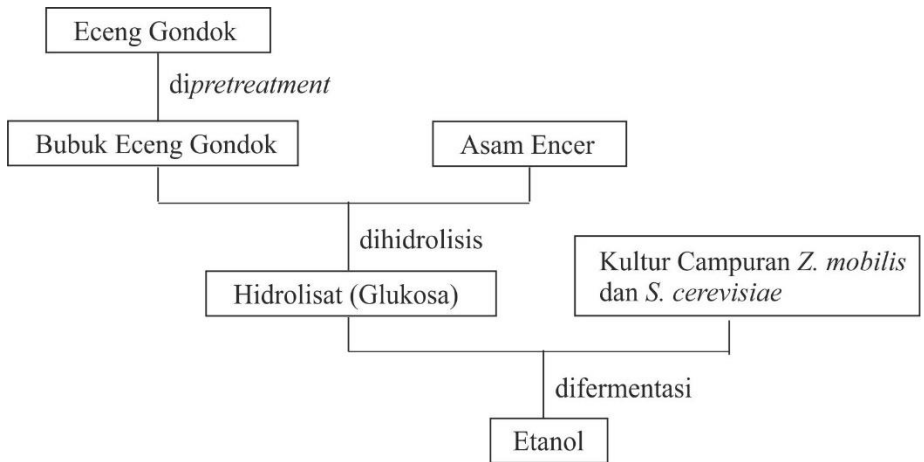
Yanase, H. (2014). *Zymomonas*. Pada C. A. Batt (Ed.), Encyclopedia of Food Microbiology Second Edition (p. 856-863). London, UK : Elsevier, Ltd.

Zhang, Q., Wei, Y., Han, H., Weng, C. (2017). Enhancing Bioethanol Production from Water Hyacinth by New Combined Pretreatment Methods. Bioresource Technology. 251, 358-363.

“Halaman ini Sengaja Dikosongkan”

Lampiran 1

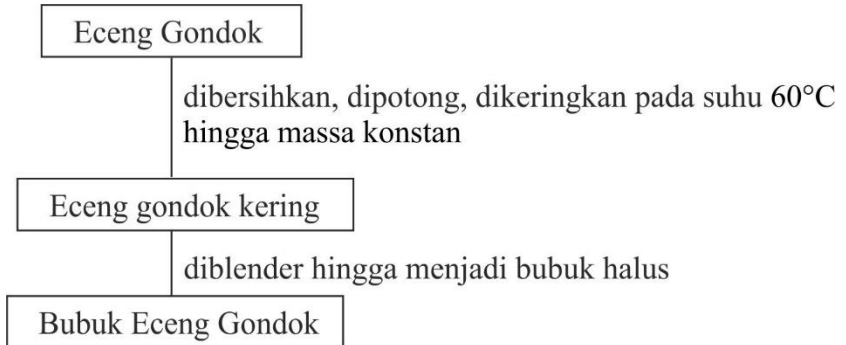
Diagram Alir Penelitian



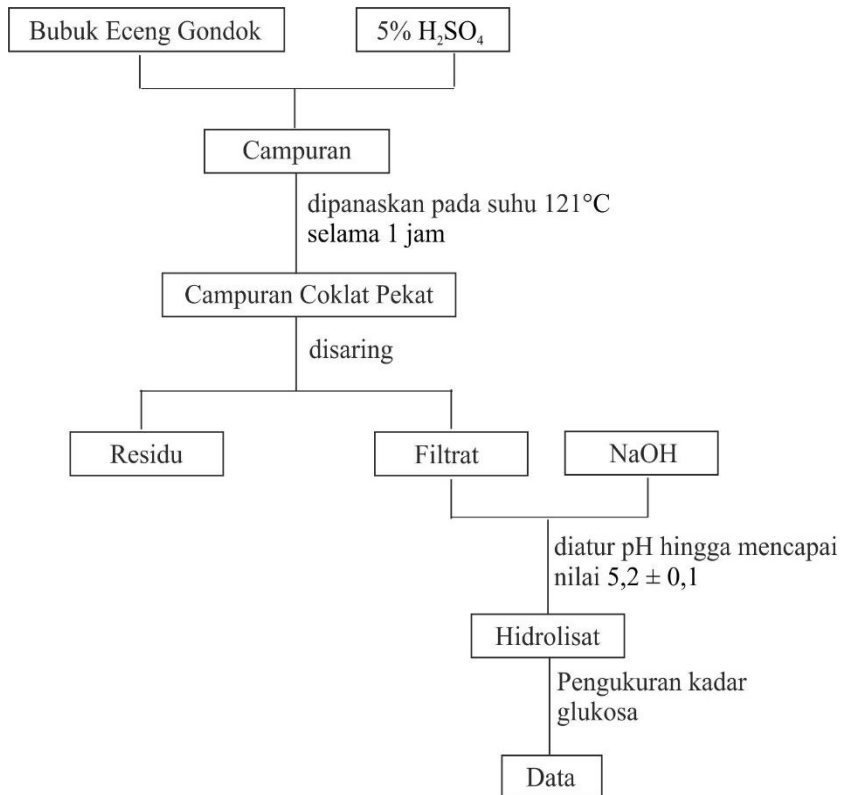
Lampiran 2

Prosedur Penelitian

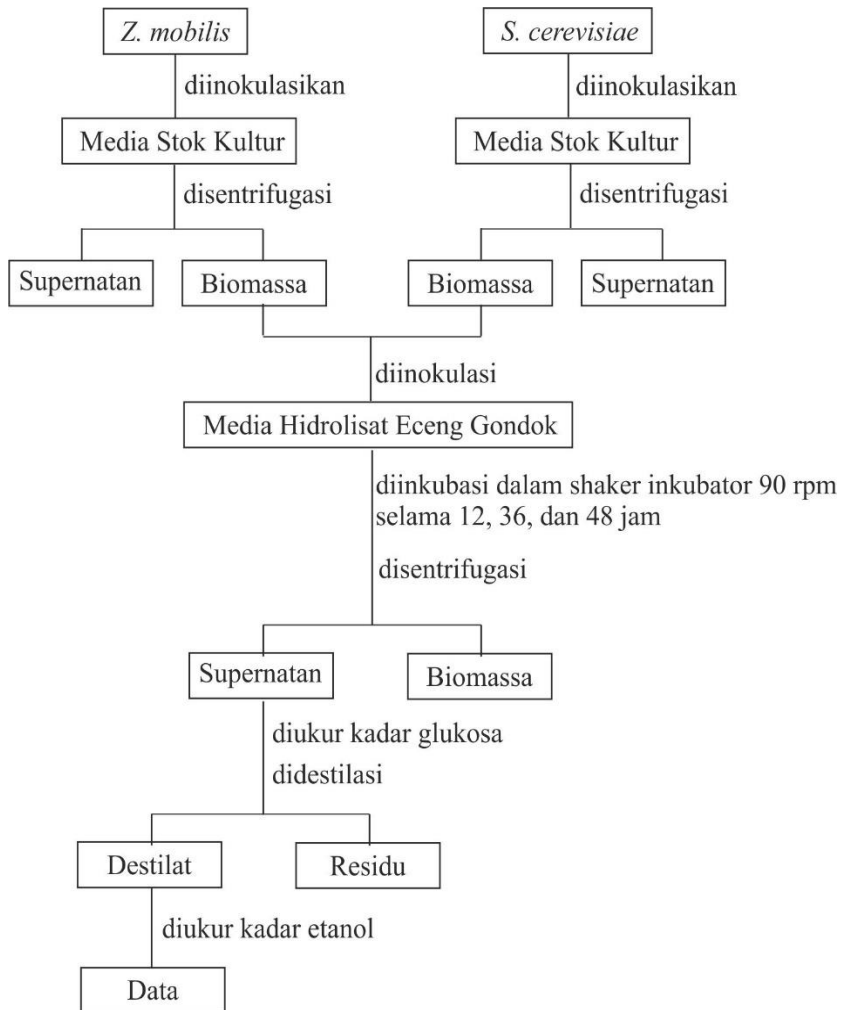
1. Pretreatment Fisik Eceng Gondok



2. Hidrolisis Bubuk Eceng Gondok dengan Asam Encer



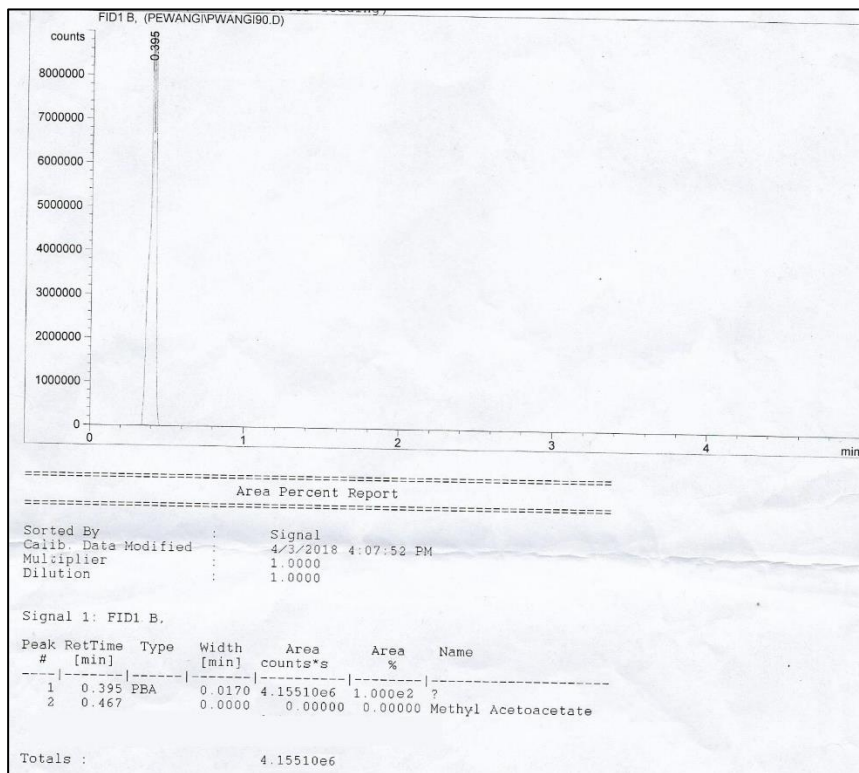
3. Fermentasi Hidrolisat Eceng Gondok



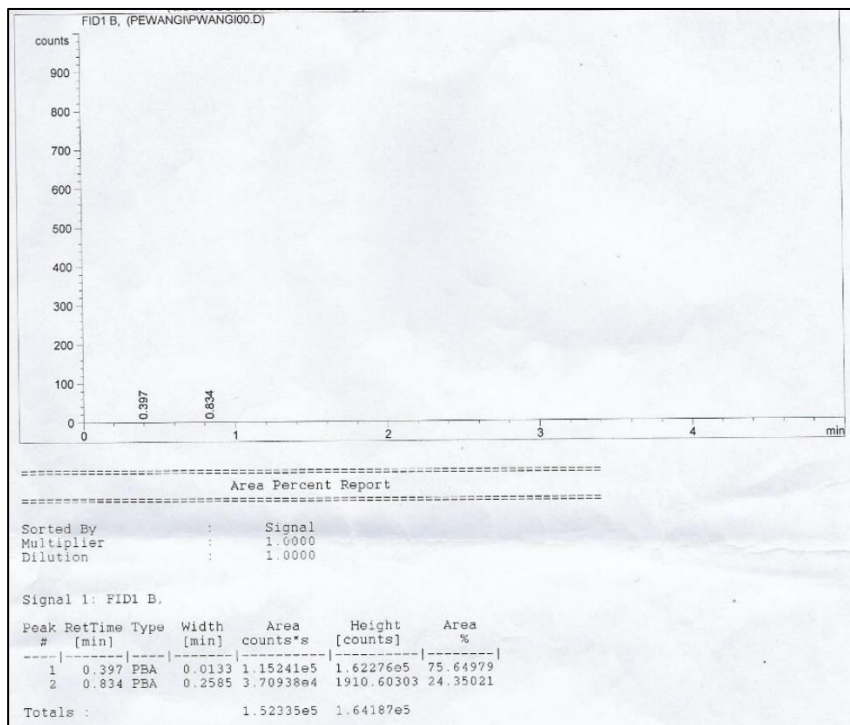
Lampiran 3

Hasil Analisa GC

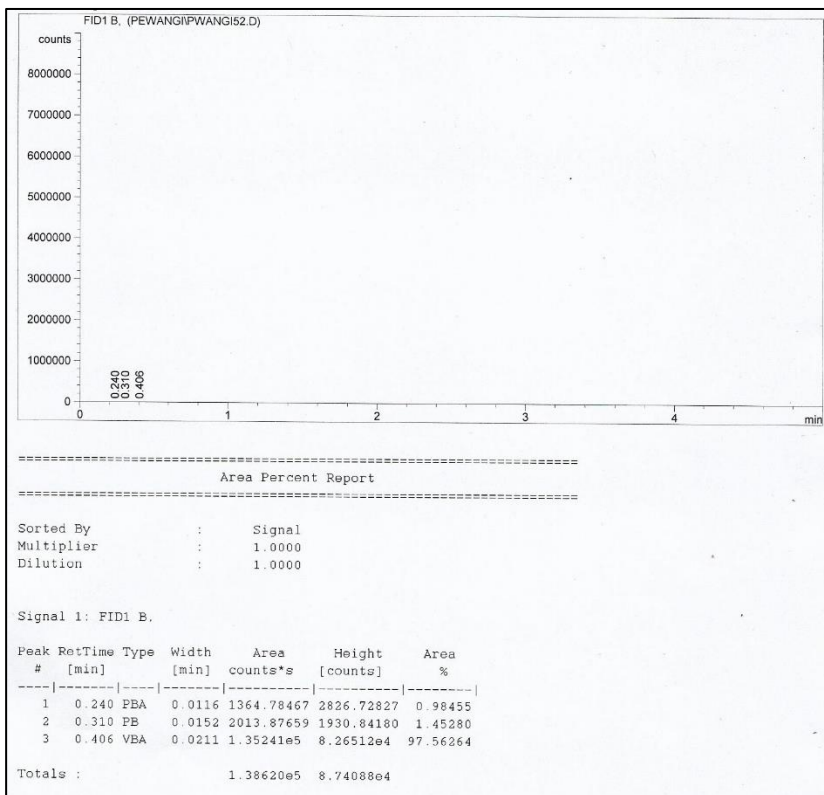
1. Standar etanol 98%



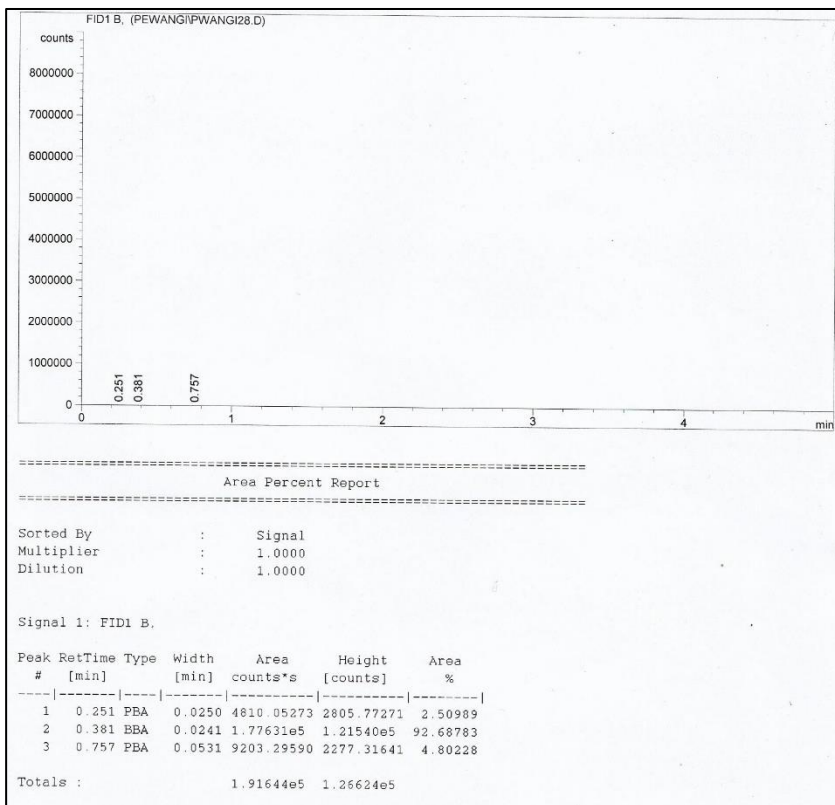
2. Fermentasi 12 jam



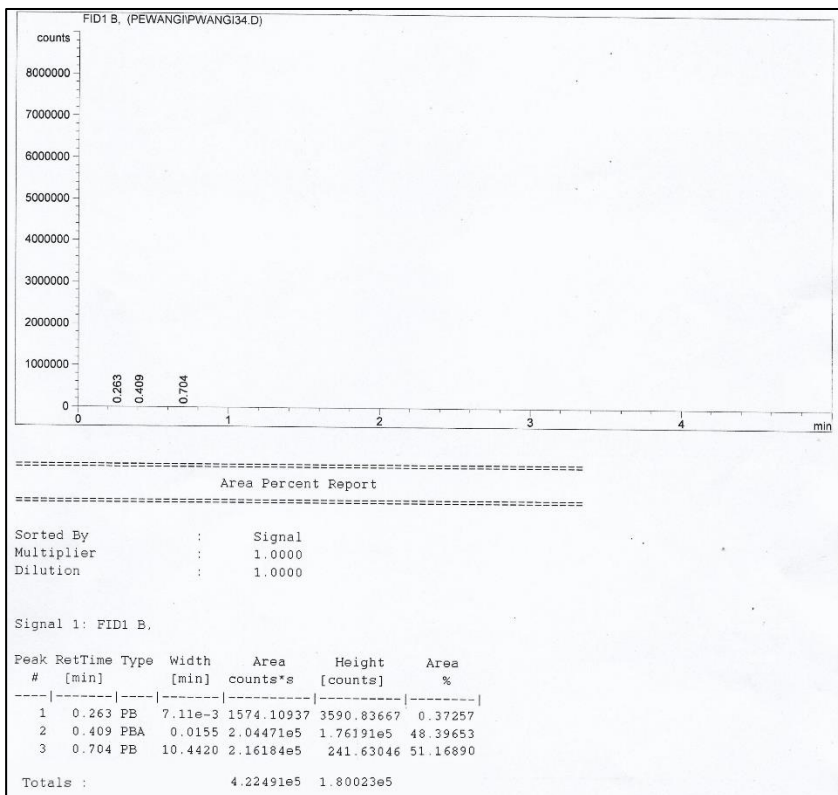
3. Fermentasi 24 jam



4. Fermentasi 36 Jam



5. Fermentasi 48 jam



“Halaman ini Sengaja Dikosongkan”

RIWAYAT PENULIS



Penulis memiliki nama lengkap Nadya Eka Pratiwi , dilahirkan di Samarinda, 5 September 1997 merupakan anak pertama dari dua bersaudara. Penulis telah menempuh pendidikan formal di SD Muhammadiyah 1 Samarinda (2003), SMP Negeri 1 Samarinda (2009), dan SMA Negeri 2 Pare, Kediri (2011). Pada tahun 2014, penulis diterima di Departemen Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya melalui jalur SNMPTN dan terdaftar dengan NRP 1414100010. Selama menempuh pendidikan di ITS, penulis aktif dalam organisasi Himpunan Mahasiswa Kimia ITS (HIMKA-ITS) periode 2015/2016 sebagai staff Departemen Sosial HIMKA-ITS. Penulis juga aktif dalam Unit Kegiatan Mahasiswa Maritime Challenge sebagai Ketua Divisi Sosial Budaya periode 2015/2016 dan 2016/2017 serta menjadi *volunteer* ITS International Office periode 2016/2017 sebagai anggota divisi *Internationalization and Development*. Penulis dapat dihubungi melalui email nadyaepratiwi@gmail.com.